

# **LAPORAN TAHUNAN HIBAH BERSAING**



**JUDUL:**

**BIOPROSPEKSI BAKTERI THERMOFILIK PENGHASIL  
*CATIONIC ANTIMICROBIAL PEPTIDES* (AMPS)  
SEBAGAI AGEN ANTIKANKER DAN ANTIMIKROBIA**

**Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun**

<b>Evy Yulianti, M.Sc</b>	<b>0026078002</b>
<b>Anna Rakhmawati, M.Si</b>	<b>0002017703</b>
<b>dr Kartika Ratna Pertiwi, M.Biomed Sc</b>	<b>0009028101</b>

**Dibiayai oleh :**

**Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat  
Kementrian Pendidikan dan Kebudayaan**

**Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penugasan Penelitian Hibah Bersaing  
Nomor : 532a/BOPTN/UN34.21/2013 tanggal 27 Mei 2013**

**UNIVERSITAS NEGERI YOGYAKARTA  
November 2013**

## HALAMAN PENGESAHAN

**Judul Kegiatan** : Bioprospeksi Bakteri Termofilik Penghasil Cationic Antimicrobial Peptides (AMPs) Sebagai Agen Antikanker dan Antimikrobia

**Peneliti / Pelaksana**

Nama Lengkap : EVY YULIANTI S.Si.,M.Sc.

NIDN : 0026078002

Jabatan Fungsional :

Program Studi : Pendidikan Biologi

Nomor HP : 081328703767

Surel (e-mail) : evy.yulianti@yahoo.com

**Anggota Peneliti (1)**

Nama Lengkap : S.Si. ANNA RAKHMAWATI M.Si.

NIDN : 0002017703

Perguruan Tinggi : UNIVERSITAS NEGERI YOGYAKARTA

**Anggota Peneliti (2)**

Nama Lengkap : dr. KARTIKA RATNA PERTIWI M.Biomed.Sc

NIDN : 0009028101

Perguruan Tinggi : UNIVERSITAS NEGERI YOGYAKARTA

**Institusi Mitra (jika ada)**

Nama Institusi Mitra :

Alamat :

Penanggung Jawab :

**Tahun Pelaksanaan** : Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun

**Biaya Tahun Berjalan** : Rp. 40.000.000,00

**Biaya Keseluruhan** : Rp. 99.108.000,00

Mengetahui  
Dekan FMIPA UNY



(Dr. Hartono)

NIP/NIK 196203291987021002

Yogyakarta, 26 - 11 - 2013,  
Ketua Peneliti,

(Evy YULIANTI S.Si.,M.Sc.)

NIP/NIK 198007262005012001

Menyetujui,  
Ketua LPPM UNY



(Prof. Dr. Anik Gufron, M.Pd)

NIP/NIK 196211111988031001

## RINGKASAN

Berkembangnya terapi antikanker dan antimikrobia menyebabkan penemuan agen antikanker dan antimikrobia dengan mekanisme kerja yang berbeda semakin menarik untuk diteliti karena adanya resistensi sel kanker maupun sel mikrobia terhadap obat-obatan yang sudah ada. Beberapa penelitian yang telah dilakukan menunjukkan adanya senyawa protein yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang bersifat toksik terhadap bakteri tetapi tidak untuk sel mamalia normal yang menunjukkan aktivitas melawan sel kanker. Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk melihat aktivitas antibakteri, antifungi dan antikanker dari protein yang dihasilkan oleh bakteri termofilik. Pada tahun pertama penelitian ini, dilakukan identifikasi mikroorganisme penghasil *Antimicrobial Peptides* (AMP) secara morfologis dan kimiawi; fermentasi; pemisahan/pemurnian protein; melihat profil protein, uji bioaktivitas protein dan cell free extract hasil fermentasi terhadap bakteri dan fungi patogen, dan uji sitotoksik protein terhadap sel kanker T47D. Identifikasi morfologis dan kimiawi berdasar pada Bergey's manual. Uji aktivitas antimikrobia dilakukan berdasarkan terbentuknya zona jernih pada medium dengan mikrobia uji yang diberi paper disk yang ditetesi protein dan cell free extract hasil fermentasi masing-masing isolat. Mikrobia uji yang digunakan adalah *E coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Candida albican*. Uji sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dilakukan dengan metode MTT assay. Hasil dari penelitian ini adalah diperoleh 6 isolat bakteri termofilik yang menghasilkan AMP dengan karakteristik yang berbeda-beda, yaitu isolat D94b, D153, D104c, D83, D113 dan D110. Pengujian antimikrobia menunjukkan bahwa baik protein maupun cell free ekstrak yang dihasilkan oleh 6 isolat tersebut mempunyai kemampuan antimikrobia pada mikrobia uji dengan MIC dan diameter zona hambat yang berbeda kecuali protein yang dihasilkan oleh isolat D83 dan D104c yang tidak memiliki kemampuan antibakteri terhadap *E coli*. Hasil uji sitotoksik menunjukkan bahwa  $IC_{50}$  protein masing-masing isolat terhadap sel kanker T47D berbeda beda, yaitu isolat D83 436,5  $\mu\text{g/mL}$ , D94b 954,99  $\mu\text{g/mL}$ , D110a 629,5  $\mu\text{g/mL}$ , D104c 371,5  $\mu\text{g/mL}$ , D113 501,1  $\mu\text{g/mL}$ , dan D153 2,35  $\mu\text{g/mL}$ . Pada penelitian tahun kedua, akan dilakukan pemurnian protein dan pengujian lebih lanjut protein yang memiliki potensi sebagai antikanker, yaitu dari isolat D153 dan mengetahui mekanismenya dengan melihat pengaruh protein terhadap daur sel, proliferasi sel, kemampuan dalam menginduksi apoptosis dan melihat penggandaan sel (*doubling time*) sel kanker T47D.

Kata kunci : bakteri termofilik, antikanker, antibakteri, antifungi, *Antimicrobial Peptides*

## KATA PENGANTAR

Puji Syukur kami panjatkan ke hadirat Allah SWT atas terlaksananya penelitian dengan judul “Bioprospeksi Bakteri Termofilik Penghasil *Cationic Antimicrobial Peptides* (AMPs) Sebagai Agen Antikanker dan Antimikrobia”.

Kegiatan ini merupakan salah satu kegiatan penelitian dari skema penelitian Hibah Bersaing dengan dana BOPTN UNY tahun anggaran 2013. Penelitian ini merupakan penelitian tahun pertama dari dua tahun yang direncanakan. Adapun tujuan umum dari penelitian tahun pertama ini adalah untuk melihat aktivitas antibakteri, antifungi dan antikanker dari protein dan cell free extract yang dihasilkan oleh bakteri termofilik.

Pada tahun pertama penelitian ini, dilakukan identifikasi mikroorganisme penghasil *Antimicrobial Peptides* (AMP) secara morfologis dan kimiawi; fermentasi; pemisahan/pemurnian protein; melihat profil protein, uji bioaktivitas protein dan cell free extract hasil fermentasi terhadap bakteri dan fungi patogen, dan uji sitotoksik protein terhadap sel kanker T47D

Kami harapkan hasil yang diperoleh dari penelitian ini bermanfaat bagi masyarakat dan bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Ucapan terimakasih kami sampaikan kepada pihak Kementrian Pendidikan dan Kebudayaan melalui Dirjen Dikti yang telah mengalokasikan dana untuk pelaksanaan penelitian ini, Dr Hartono selaku Dekan FMIPA yang telah memberikan kesempatan dan memfasilitasi waktu dan tempat dalam melaksanakan penelitian ini, Prof Dr Anik Ghufroon selaku Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat dan jajarannya yang telah memberikan kesempatan dan memfasilitasi seminar proposal dan seminar hasil penelitian ini, Kepala Lab Mikrobiologi FMIPA UNY, Kepala Lab Bioteknologi PAU UGM dan Kepala Lab Parasitologi FK UGM yang telah memberikan ijin kepada kami untuk melakukan penelitian ini. Tim Peneliti, Anna Rakhmawati, M.Si dan dr Kartika Ratna Pertiwi, M.Biomed, Sc yang telah berperan dalam pelaksanaan penelitian. Laboran dan mahasiswa yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

Yogyakarta, 20 November 2013

Tim Peneliti

## DAFTAR ISI

	Hal
Halaman Sampul	i
Halaman Pengesahan	ii
Ringkasan	iii
Kata Pengantar	iv
Daftar Isi	v
Daftar Tabel	vi
Daftar Gambar	Vii
Daftar Lampiran	Ix
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Batasan Dan Rumusan Masalah	2
C. Urgensi Penelitian	2
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
A. Bakteri Termofilik	4
B. Antimicrobial Peptide	6
C. Kanker	8
D. Kanker Payudara	9
E. Daur Sel	9
F. Kematian Sel	11
BAB III TUJUAN DAN MANFAAT	13
A. Tujuan Penelitian	13
B. Manfaat Penelitian	13
BAB IV METODE PENELITIAN	14
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	17
A. Hasil	17
B. Pembahasan	34
BAB VI RENCANA DAN TAHAPAN BERIKUTNYA	36
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN	38
DAFTAR PUSTAKA	39
LAMPIRAN	

## **DAFTAR TABEL**

	<b>Hal</b>
1. Tabel 1. Data hasil reisolasi isolat bakteri termofilik	<b>17</b>
2. Tabel 2. Hasil karakterisasi morfologi koloni	<b>18</b>
3. Tabel 3. Hasil karakterisasi morfologi dan biokimia sel	<b>18</b>
4. Tabel 4. Hasil uji antibakteri dan antijamur ketujuh isolat	<b>20</b>
5. Tabel 5. Hasil uji aktivitas antibakteri dan antifungi koloni ketujuh isolat	<b>20</b>
6. Tabel 6. Hasil Uji antimikrobia protein dan cell free extract hasil fermentasi 6 isolat	<b>22</b>
7. Tabel 7. Konsentrasi protein ekstraseluler masing-masing isolat	<b>29</b>
8. Tabel 8. Hasil pembacaan nilai absorbansi sel hidup dari lima seri konsentrasi protein isolat D83	<b>29</b>
9. Tabel 9. Hasil pembacaan nilai absorbansi sel hidup dari lima seri konsentrasi protein isolat D94b	<b>30</b>
10. Tabel 10. Hasil pembacaan nilai absorbansi sel hidup dari lima seri konsentrasi protein isolat D110a	<b>30</b>
11. Tabel 11. Hasil pembacaan nilai absorbansi sel hidup dari lima seri konsentrasi protein isolat D104	<b>31</b>
12. Tabel 12. Hasil pembacaan nilai absorbansi sel hidup dari lima seri konsentrasi protein isolat D113	<b>32</b>
13. Tabel 13. Hasil pembacaan nilai absorbansi sel hidup dari lima seri konsentrasi protein isolat D153	<b>32</b>

## DAFTAR GAMBAR

	<b>Hal</b>
1. Gambar 1. Mekanisme kerja antimicrobial peptide dan mekanisme resistensinya	7
2. Gambar 2. Daur sel dan beberapa kompleks CDK/ <i>cyclin</i> pengatur (Vermeulen <i>et al.</i> , 2003)	9
3. Gambar 3. Mekanisme <i>signaling</i> di dalam sel	11
4. Gambar 4. Roadmap Penelitian	12
5. Gambar 5. Isolat D110a dengan perbesaran 400x	19
6. Gambar 6. Isolat D83 dengan perbesaran 400x	19
7. Gambar 7. Isolat D104c dengan perbesaran 400x	19
8. Gambar 8. Isolat D113 dengan perbesaran 400x	19
9. Gambar 9. Isolat D132 dengan perbesaran 400x	19
10. Gambar 10. Isolat D94b dengan perbesaran 400x	19
11. Gambar 11. Isolat D153 dengan perbesaran 400x	19
12. Gambar 12. Nisbah zona jernih masing-masing bakteri termofilik terhadap mikrobia uji.	21
13. Gambar 13. Uji aktivitas antimikrobia isolat D83 terhadap a. <i>Eschericia coli</i> b. <i>Candida albican</i>	21
14. Gambar 14. Uji aktivitas antimikrobia isolat D94b terhadap a. <i>Staphylococcus aureus</i> b. <i>Candida</i>	21
15. Gambar 15. Uji aktivitas antimikrobia isolat D104c terhadap <i>Eschericia coli</i>	21
16. Gambar 16. Uji aktivitas antimikrobia isolat D110a terhadap a. <i>Staphylococcus aureus</i> b. <i>Candida albican</i>	21
17. Gambar 17. Uji aktivitas antimikrobia isolat D113 terhadap a. <i>Staphylococcus aureus</i> b. <i>Candida albican</i>	21
18. Gambar 18. Uji aktivitas antimikrobia isolat D132b terhadap a. <i>Eschericia coli</i> b. <i>Candida albican</i>	21
19. Gambar 19. Uji aktivitas antimikrobia isolat D153 terhadap a. <i>Staphylococcus aureus</i> b. <i>Candida albican</i>	22
20. Gambar 20. Diameter zona hambat yang dihasilkan protein isolat D113a	24
21. Gambar 21. Diameter zona hambat yang dihasilkan cell free extract isolat D113a	25
22. Gambar 22. Diameter zona hambat yang dihasilkan protein isolat D94b	25
23. Gambar 23. Diameter zona hambat yang dihasilkan cell free extract isolat D94b	25
24. Gambar 24. Diameter zona hambat yang dihasilkan protein isolat D153	26
25. Gambar 25. Diameter zona hambat yang dihasilkan cell free extract isolat D153	26
26. Gambar 26. Diameter zona hambat yang dihasilkan protein isolat D104c	26
27. Gambar 27. Diameter zona hambat yang dihasilkan cell free extract isolat D104c	27
28. Gambar 28. Diameter zona hambat yang dihasilkan protein isolat D83	27

<b>29.</b>	<b>Gambar 29. Diameter zona hambat yang dihasilkan cell free extract isolat D83</b>	<b>27</b>
<b>30.</b>	<b>Gambar 30. Diameter zona hambat yang dihasilkan protein isolat D110a</b>	<b>28</b>
<b>31.</b>	<b>Gambar 31. Diameter zona hambat yang dihasilkan cell free extract isolat D110a</b>	<b>28</b>
<b>32.</b>	<b>Gambar 32. Hasil SDS PAGE protein dari 6 isolat</b>	<b>28</b>
<b>33.</b>	<b>Gambar 33. Hubungan antara konsentrasi protein dengan % sel hidup</b>	<b>29</b>
<b>34.</b>	<b>Gambar 34. Hubungan antara konsentrasi protein dengan % sel hidup</b>	<b>30</b>
<b>35.</b>	<b>Gambar 35. Hubungan antara konsentrasi protein dengan % sel hidup</b>	<b>31</b>
<b>36.</b>	<b>Gambar 36. Hubungan antara konsentrasi protein dengan % sel hidup</b>	<b>31</b>
<b>37.</b>	<b>Gambar 37. Hubungan antara konsentrasi protein dengan % sel hidup</b>	<b>32</b>
<b>38.</b>	<b>Gambar 38. Hubungan antara konsentrasi protein dengan % sel hidup</b>	<b>33</b>
<b>39.</b>	<b>Gambar 39. Morfologi sel T47D setelah diberi protein (kiri) dan MTT (kanan) dari isolat D83</b>	<b>33</b>
<b>40.</b>	<b>Gambar 40. Morfologi sel T47D setelah diberi protein (kiri) dan MTT (kanan) dari isolat D94b</b>	<b>33</b>
<b>41.</b>	<b>Gambar 41. Morfologi sel T47D setelah diberi protein (kiri) dan MTT (kanan) dari isolat D110a</b>	<b>33</b>
<b>42.</b>	<b>Gambar 42. Morfologi sel T47D setelah diberi protein (kiri) dan MTT (kanan) dari isolat D104c</b>	<b>33</b>
<b>43.</b>	<b>Gambar 43. Morfologi sel T47D setelah diberi protein (kiri) dan MTT (kanan) dari isolat D113</b>	<b>34</b>
<b>44.</b>	<b>Gambar 44. Morfologi sel T47D setelah diberi protein (kiri) dan MTT (kanan) dari isolat D153</b>	<b>34</b>



## **DAFTAR LAMPIRAN**

Tim Peneliti

Publikasi

Isolat Hasil Reisolasi

Hasil Uji Antibakteri Koloni

Hasil Uji Antijamur Koloni

Hasil Uji Antimikrobia Protein Dan Cfe

Hasil Pembacaan Elisa Reader

Kontrak Penelitian

Berita Acara Seminar Proposal

## BAB I PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang

Semakin banyaknya kemajuan di bidang terapi kanker menyebabkan semakin berkembangnya agen-agen antikanker dengan mekanisme kerja yang berbeda, karena sel kanker yang ada saat ini sudah mengalami resistensi terhadap obat-obatan yang diberikan. Beberapa studi yang telah dilakukan sebelumnya menunjukkan bahwa beberapa *cationic antimicrobial peptides* (AMPs), memiliki sifat toksik terhadap bakteri yang lain tetapi tidak pada sel mamalia yang normal, dan senyawa ini bersifat toksik terhadap sel kanker dengan aktivitas sitotoksik spektrum luas. Secara alami AMP merupakan senyawa kimia yang dihasilkan oleh sel eukariotik untuk melawan bakteri, protozoa, fungsi dan virus. Senyawa ini juga bisa ditemukan pada bakteri, fungi, tanaman maupun hewan (Hoskin, D. W. and Ramamoorthy, A., 2008).

Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa AMP, baik yang sintetik maupun alami bisa meningkatkan sistem imun dan berpotensi sebagai antibiotik yang potensial. Adanya ikatan elektrostatis antara komponen bakteri dan sel kanker yang bermuatan negatif dan AMP yang bermuatan positif dipercaya berperana penting untuk membuat ikatan yang kuat dan selektif di dalam merusak membran sel bakteri maupun sel kanker. Sebagian besar AMP dapat membunuh bakteri baik yang gram positif maupun gram negatif, dan sejumlah peptida bakterisidal ini juga memiliki aktivitas antikanker dan antiviral. Peptida yang ditemukan memiliki kemampuan dalam menetralkan lipopolisakarida (LPS) dan kemampuan untuk meningkatkan respon imun adaptif (Hoskin, D. W. and Ramamoorthy, A., 2008).

Pengobatan kanker pada umumnya didasarkan pada upaya pengambilan jaringan kanker atau dengan mematikan sel kanker dan meminimalkan efek pengobatan terhadap sel normal disekitarnya. Saat ini pengambilan kanker yang paling utama adalah operasi, radioterapi dan kemoterapi, namun ketiga jenis pengobatan tersebut memiliki kekurangan. Operasi akan berhasil pada beberapa tumor yang telah berkembang, tetapi sulit mengobati pada stadium awal metastasis (Lodish *et al.*, 2000). Pengobatan dengan radiasi mampu membunuh tumor lokal namun radiasi juga akan membunuh sel normal disekitarnya. Sebagian besar obat kemoterapi seperti taxol, 5-fluorourasil (5-FU) dan adriamisin memiliki target pada pembelahan sel (Boyer *and* Tannock, 2005), tetapi kemoterapi ini bisa menyebabkan diare dan kerontokan rambut. Agen kemoterapi ini juga tidak efektif untuk sel

yang mengalami mutasi p53. Sehingga perlu dikembangkan agen-agen baru untuk pengobatan kanker yang aman (Lodish *et al.*, 2000).

## **B. Batasan dan Rumusan Masalah**

Penelitian ini dibatasi hanya untuk melihat isolat apasajakah yang menghasilkan AMP dan apakah protein dan cell free ekstrak dari bakteri termofilik yang diperoleh dari sungai Gendol atas memiliki aktivitas antibakteri, antifungi dan antikanker serta melihat karakteristik isolat tersebut.

Rumusan masalah dari penelitian pada tahun pertama adalah:

1. Isolat bakteri mana yang menghasilkan *Cationic Antimicrobial Peptides* (AMPs)
2. Bagaimana karakter morfologis, kimiawi bakteri termofilik penghasil AMP
3. Bagaimana efek sitotoksik protein terhadap sel kanker T47D.
4. Bagaimana efek antibakteri protein dan cell free extract terhadap bakteri patogen
5. Bagaimana efek antifungi protein dan cell free extract terhadap fungi patogen

## **C. Urgensi Penelitian**

Kemopreventif adalah area inovatif pada penelitian kanker yang bertujuan pada pengembangan farmakologi, biologi, dan interferensi nutrisi untuk mencegah, memperbaiki, dan memperlambat karsinogenesis. Tindakan ini sekarang mencakup agen preklinik dan identifikasi molekuler, skrining *in vitro* dan *in vivo*, dampak farmakologi, dan sintesis kimia (Crowel, 2005). Identifikasi dan penggunaan agen kemopreventif yang efektif pada kanker menjadi isu penting pada penelitian kesehatan masyarakat. Untuk mengidentifikasi potensi kemoprevensi pada kanker dilakukan uji *in vitro* yang relevan untuk pencegahan secara *in vivo* (Gerhäuser, 2002).

Pengobatan kanker pada umumnya didasarkan pada upaya pengambilan jaringan kanker atau dengan mematikan sel kanker dan meminimalkan efek pengobatan terhadap sel normal disekitarnya. Saat ini pengambilan kanker yang paling utama adalah operasi, radioterapi dan kemoterapi, namun ketiga jenis pengobatan tersebut memiliki kekurangan. Operasi akan berhasil pada beberapa tumor yang telah berkembang, tetapi sulit mengobati pada stadium awal metastasis (Lodish *et al.*, 2000). Pengobatan dengan radiasi mampu membunuh tumor lokal namun radiasi juga akan membunuh sel normal disekitarnya. Sebagian besar obat kemoterapi seperti taxol, 5-fluorourasil (5-FU) dan adriamisin memiliki target pada pembelahan sel (Boyer and Tannock, 2005), tetapi kemoterapi ini bisa menyebabkan diare dan kerontokan rambut. Agen kemoterapi ini juga tidak efektif untuk sel

yang mengalami mutasi p53. Sehingga perlu dikembangkan agen-agen baru untuk pengobatan kanker yang aman (Lodish *et al.*, 2000).

Akhir-akhir ini penggunaan bahan alami sebagai obat untuk mengendalikan kanker sangat diminati, karena bahan alami dianggap tidak memiliki efek samping yang membahayakan apabila dibandingkan dengan kemoterapi yang memiliki toksisitas dan efek samping tinggi. Senyawa metabolit sekunder pada bahan alami secara biologis dapat memberi pertahanan terhadap penyakit. Pendekatan terapi kanker menggunakan agen kemopreventif lebih menjanjikan daripada obat antikanker konvensional. Agen kemopreventif sendiri dapat didefinisikan sebagai senyawa yang dapat menghambat dan menekan proses karsinogenesis pada manusia sehingga pertumbuhan kanker dapat dicegah (Kakizoe, 2003). Adanya permasalahan mengenai resistensi antibiotik sebagai masalah kesehatan global yang membutuhkan penemuan antibiotik baru menyebabkan adanya keinginan untuk mengembangkan AMP sebagai agen terapi untuk manusia.

Proses perkembangan sel normal menjadi sel kanker memerlukan waktu yang panjang, oleh karena itu banyak kesempatan untuk mengintervensi perkembangan kanker. Kemoprevensi adalah strategi pencegahan dan menahan perkembangan kanker menggunakan bahan alami, sintesis atau kombinasi keduanya (Khan *et al.*, 2007). Kemoprevensi bisa dilakukan pada tahap inisiasi karsinogenesis maupun progresi sel neoplastik menjadi kanker (Greenwald, 2002, Martin, 2006). Agen yang digunakan dalam kemoprevensi memerlukan perlakuan yang berkesinambungan serta harus tidak berbahaya bagi kesehatan (Okey *et al.*, 2005). Agen kemoprevensi harus memiliki toksisitas rendah bila dibandingkan dengan agen kemoterapi (Greenwald, 2002).

Dari penelitian ini diharapkan akan diperoleh isolat-isolat bakteri termofilik yang mampu menghasilkan *Antimicrobial Peptides* (AMP) sebagai bahan yang bersifat antimikrobia dan antikanker dan diperoleh mekanisme kerja senyawa antikanker, sehingga diharapkan, nantinya akan dikembangkan sebagai alternatif senyawa antikanker dan antimikrobia

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### A. Bakteri Termofilik

Termofilik merupakan organisme, terutama mikroorganisme yang mampu beradaptasi tumbuh optimal pada suhu tinggi. Mikroorganisme termofil telah berhasil diisolasi dari habitat terestrial maupun perairan dengan suhu tinggi misalnya daerah gunung berapi dan sumber air panas (Bertoldo and Antranikian, 2002).

Berdasarkan temperatur optimum pertumbuhannya, maka termofilik dapat dijadikan dalam 3 kategori yaitu: *Moderate thermophiles* dengan temperatur pertumbuhan optimum berkisar antara 35-70 °C, *Extreme thermophiles*, temperatur pertumbuhan optimum berkisar 55-85 °C, *Hyperthermophiles*, temperatur pertumbuhan optimum berkisar 75-113 °C (Baker *et al.*, 2001).

Sedangkan pengelompokan termofil menurut Hughes dan Williams (1977) adalah *Obligate thermophiles*, temperatur pertumbuhan optimum 65-75 °C, dan tidak mampu tumbuh dibawah 40 °C, *Facultative thermophiles*, dapat tumbuh optimal pada temperature 50-60 °C, dan mampu tumbuh pada 37 °C, *Thermotolerant thermophiles*, pertumbuhan maksimum pada temperatur 45-50 °C, mampu tumbuh pada 30 °C

Studi ekologis menunjukkan berbagai spesies mikroorganisme dapat eksis dalam lingkungan termofil (Madigan *et al.*, 2009). *Extreme thermophiles* pada umumnya termasuk *Bacillus*, *Clostridium*, *Thermoanaerobacter*, *Thermus*, *Thermotoga*, dan *Aquifex*. *Hyperthermophiles*, termasuk dalam domain *Archaea*, kingdom *Crenarchacota* (*Sulfolobus*, *Pyrodictium*, *Pyrolobus*.), dan kingdom *Euryarchaeaota* (*Thermococcus*, *Pyrococcus* ), methanogenes (*Methanococcus*, *Methanobacterium*), pereduksi sulfat dan halophiles (Bertoldo and Antrakian, 2002).

Salah satu karakter paling menarik dari termofil adalah kemampuannya dalam memproduksi enzim yang mampu mengkatalis reaksi pada suhu lebih tinggi dibandingkan organisme mesofilik (Demirjian *et al.*, 2001). Properti stabilitas suhu yang lebih tinggi dan toleransi terhadap bahan kimiawi penyebab denaturasi seperti pelarut organik (Aguilar *et al.*, 1998; Kristjansson, 1989). Kenaikan temperatur dalam proses bioteknologi mempengaruhi ketersediaan dan solubitas senyawa organik seperti poliaromatik, hidrokarbon alifatik, dan substansi polimer. Kenaikan temperatur juga berhubungan dengan penurunan viskositas dan kenaikan koefisien difusi senyawa organik. Hal ini berakibat kecepatan reaksi akan lebih tinggi (Niehaus *et al.*, 1999). Enzim termofil memiliki tingkat kontaminasi yang rendah, kecepatan reaksi lebih baik, dan stabil pada temperatur tinggi (Edward, 1990). Proses-proses

biologis ketika dioperasikan dengan suhu diatas 60 °C akan mengurangi resiko kontaminan oleh organisme lain (Adams and Kelly, 1998). Mikrobia termofil mampu menghasilkan enzim termofil sehingga reaksi enzimatik dapat berjalan lebih cepat, mempercepat difusi, daya larut bahan semakin besar, memperkecil viskositas dan tegangan permukaan media (Hartiko, 1992). Kebanyakan mikrobia mengalami penurunan efektivitas kerja setelah fermentasinya menghasilkan panas, tapi hal ini tidak terjadi pada mikrobia termofil (Edward, 1990).

Kemampuan mikrobia termofilik untuk tumbuh pada temperatur tinggi, disebabkan oleh berbagai faktor misalnya:

- a. Memiliki kemampuan mensintesa makromolekul yang stabil terhadap panas. Perbedaan intrinsik struktur makromolekul dan kofaktor stabilisasi termal. Perbedaan struktural pada molekul protein, asam nukleat, lipid, dan enzim. Enzim bakteri termofil ikatannya mempunyai tingkatan asam amino hidrofobik yang lebih tinggi daripada mikrobia mesofilik dan memiliki ion  $Mg^{2+}$  dengan stabilitas tinggi sehingga struktur ikatannya lebih erat dan lebih refraktif terhadap panas, tetap aktif, dan tidak alami denaturasi sampai temperatur lebih dari 60 °C. juga kemampuan mensintesa ribosom yang lebih stabil terhadap panas. Hal ini karena titik cair RNA-nya cukup tinggi, serta keteraturan dari pembungkusannya. Pembungkusannya terdiri atas komposisi dasar G-C dengan jumlah yang lebih banyak dan A-U lebih sedikit (Tansey dan Brock, 1978). DNA termofil juga mempunyai *reverse DNA gyrase* yang mampu memproduksi superkoil positif. Perbedaan kenaikan melting point DNA mempengaruhi stabilitas pada temperatur tinggi (Haki and Rakshit, 2003).
- b. Kemampuan termostabilitas pada membran sel, karena banyak mengandung lemak jenuh sehingga mikrobia tahan terhadap temperatur tinggi (Ray and Brock, 1971). Termofil memproduksi protein dinamakan chaperonin yang membantu menyusun kembali bentuk awalnya setelah denaturasi. Komposisi membran sel termofil asam lemak jenuh yang menyediakan lingkungan hidrofob bagi sel. Archaea yang mayoritas hipertermofil mempunyai ikatan ether pada lipid di dinding sel (Haki and Rakshit, 2003).
- c. Mensintesa senyawa poliamin unik, seperti thermion dan thermospermin yang menstabilkan perangkat sintesa protein dan melindungi makromolekul terhadap temperatur tinggi (Hartiko, 1992). Termofil memproduksi protein dinamakan chaperonin yang membantu menyusun kembali bentuk awalnya setelah denaturasi (Haki and Rakshit, 2003).

- d. Perubahan komposisi asam amino pada protein menyebabkan peningkatan interaksi elektrostatik, pembentukan ikatan hidrogen dan disulfide, peningkatan interaksi hidrofobik atau kekompakan struktur. Residu sistein lebih sedikit dan hampir tidak ditemukan pada enzim termofil. Inaktivasi sering disebabkan oleh oksidasi grup SH, kandungan sistein yang lebih sedikit dapat memproteksi proses inaktivasi. Lokalisasi residu sistein juga menentukan stabilitas protein. Contoh enzim alkohol dehidrogenase pada *Bacillus stearothermophilus* mempunyai residu sistein yang sama dengan mesofilik tetapi grup SH terletak di dalam globula protein sehingga lebih tahan terhadap suhu tinggi (Scandurra *et al.*, 1998; Mozhaev and Martinek, 1984).

Substitusi asam amino juga dapat menyebabkan kenaikan hidrofobisitas internal sehingga lebih tahan suhu tinggi. Substitusi dalam enzim termofilik seperti Lys menjadi Arg, Ser menjadi Ala, Ser menjadi Thr dan Val telah dilaporkan oleh Scandurra *et al.* (1998).

### ***B. Antimicrobial Peptide***

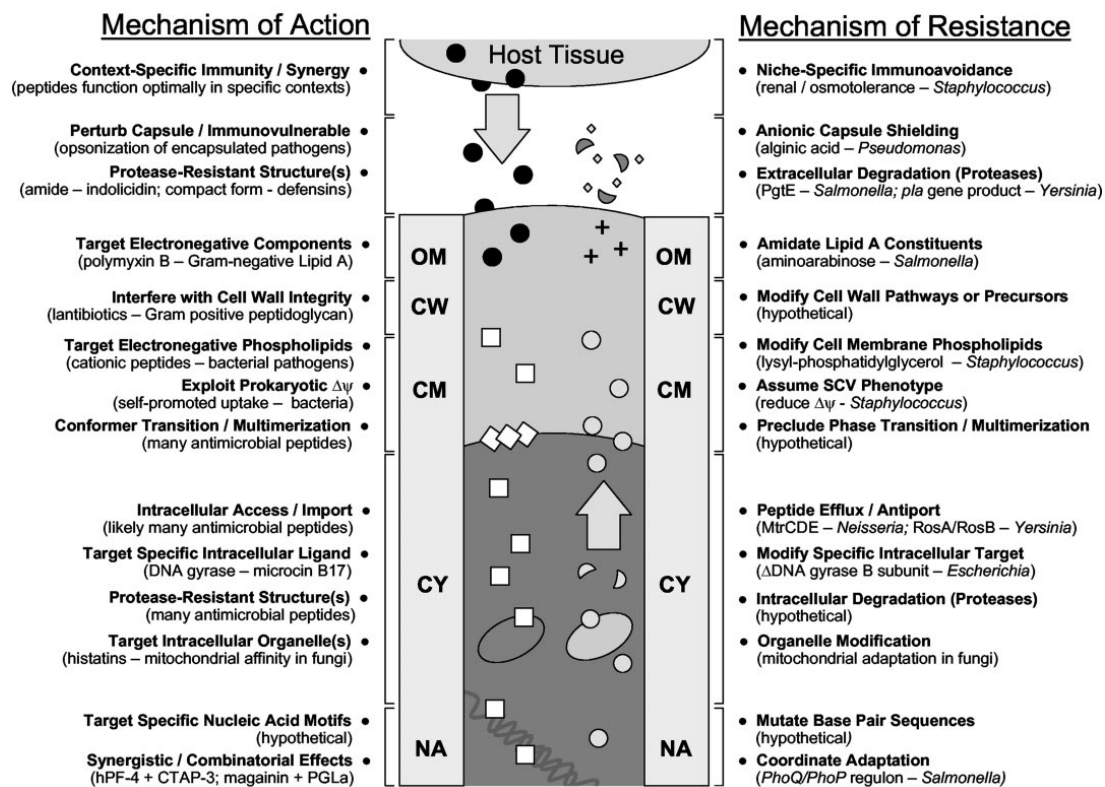
*Antimicrobial peptide* merupakan senyawa kimia yang dihasilkan oleh sel eukariotik untuk melawan bakteri, protozoa, fungsi dan virus. Senyawa ini juga bisa ditemukan pada bakteri, fungi, tanaman maupun hewan (Hoskin, D. W. and Ramamoorthy, A., 2008).

Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa AMP, baik yang sintetis maupun alami bisa meningkatkan sistem imun dan berpotensi sebagai antibiotik yang potensial. Adanya ikatan elektrostatik antara komponen bakteri dan sel kanker yang bermuatan negatif dan AMP yang bermuatan positif dipercaya berperan penting untuk membuat ikatan yang kuat dan selektif di dalam merusak membran sel bakteri maupun sel kanker. Sebagian besar AMP dapat membunuh bakteri baik yang gram positif maupun gram negatif, dan sejumlah peptida bakterisidal ini juga memiliki aktivitas antikanker dan antiviral. Peptida yang ditemukan memiliki kemampuan dalam menetralkan lipopolisakarida (LPS) dan kemampuan untuk meningkatkan respon imun adaptif (Hoskin, D. W. and Ramamoorthy, A., 2008).

Berdasarkan hasil penelitian yang sudah dilakukan, tidak semua AMP memiliki aktivitas antikanker, sehingga terdapat dua kelompok AMP, yaitu (a) AMP yang sangat poten dalam membunuh sel bakteri dan sel kanker tetapi tidak dapat membunuh sel normal mamalia, dan (b) AMP yang bersifat sitotoksik pada bakteri, sel kanker maupun sel mamalia normal. Sekuen asam amino pada MAP yang berbeda sangat heterogen dan memiliki variasi yang sangat besar pada struktur sekundernya. AMP secara umum bersifat kationik (memiliki muatan pada pH netral antara +2 sampai +9) dan bersifat anfipatik, yang memungkinkan peptida ini berinteraksi dengan membran dan merusak lipid membran. Sebagian besar AMP

memiliki struktur yang pendek, hanya terdiri dari 5 sampai 40 residu asam amino, dan sedikit jumlahnya yang memiliki panjang sampai lebih dari 40 residu. Residu yang mempunyai muatan positif seperti Lys dan Arg dan sebagian mempunyai residu yang bersifat hidrofobik (~30% atau lebih) biasanya ditemukan pada peptida ini. Sifat penting yang dimiliki oleh AMP, seperti tritripticin, lactoferrocins dan indolicidin, mereka kaya akan residu Trp dan Arg residues. Studi telah menunjukkan bahwa semua analog D-amino-acid memiliki aktivitas yang identik, tetapi memiliki khiralitas yang berkebalikan dengan semua L-peptida; sifat ini digunakan untuk mendesain AMP yang tahan terhadap degradasi proteolitik. Tidak seperti antibiotik konvensional yang biasanya berinteraksi hanya dengan target khusus, sebagian besar kationik AMP memiliki target membran sel dari mikroorganisme yang menyerang, dan menyebabkan sel lisis dan mati (Hoskin, D. W. and Ramamoorthy, A., 2008).

Perbedaan sifat biokimiawi dan biofisik dari mikrobia dengan sel inangnya dan adanya setting sel mana yang menjadi target dari peptida memberikan dasar toksitas yang selektif dari AMP. Beberapa AMP memberikan mekanisme yang dinamis dalam bekerja pada fosfolipid bilayer, sehingga memberikan pengaruh yang cepat dan poten (Yeaman, M. R. and Yount, N. Y, 2003).



Gambar 1. Mekanisme kerja antimicrobial peptide dan mekanisme resistensinya

(Yeaman, M. R. and Yount, N. Y, 2003)



### C. Kanker

Kanker merupakan penyakit yang ditandai dengan pembelahan sel terus menerus, tidak terkendali dan dapat menyebar ke jaringan lain yang terletak didekatnya. Pertumbuhan sel yang tidak terkendali tersebut disebabkan oleh kerusakan DNA akibat mutasi gen yang mengontrol pembelahan sel. Mutasi yang terjadi dapat disebabkan oleh paparan agen yang bersifat karsinogenik. Kerusakan ini diawali pada satu sel kemudian memperbanyak diri dan mendapatkan perubahan tambahan yang menguntungkan bagi kelangsungan hidupnya diantara sel tetangga yang normal. Sel abnormal tersebut berlipat ganda untuk dapat menghasilkan sel yang membentuk kanker (MacDonald *and* Ford, 1997, Lodish *et al.*, 2000, Kokha *et al.*, 2004).

Kanker dapat memperlihatkan gejala yang berbeda tergantung pada lokasi dan sifat keganasan. Pengobatan kanker dapat dilakukan dengan kemoterapi atau radioterapi. Efektifitas pengobatan kanker ditentukan oleh terapi yang benar-benar dapat menyebabkan kerusakan sel sehingga sel kanker kehilangan kemampuan untuk regenerasi sel. Agen kemoterapi yang digunakan diantaranya adalah agen pengalkilasi, agen platinum serta antimetabolit. Masing-masing agen kemoterapi memiliki efek khas daur sel pada fase G1, G2, S atau pada fase mitotik (Boyer *and* Tannock, 2005).

Kanker merupakan hasil proses jangka panjang yang mengakibatkan efek penyimpangan genetik dan perubahan molekuler yang proses perubahannya berjalan secara berangsur-angsur. Biasanya diperlukan waktu lama untuk perubahan dari normal ke peningkatan level puncaknya, displasia, yaitu invasi dan metastasis secara fenotip. Akumulasi perubahan secara genetik dan molekuler dalam waktu yang lama memberikan kesempatan untuk intervensi bidang klinik untuk pencegahan inisiasi kanker dan tindakan sebelum lesi premalignan (Crowel, 2005).

Pada keadaan normal pergantian dan peremajaan sel terjadi sesuai kebutuhan melalui proliferasi sel dan apoptosis di bawah pengaruh proto-onkogen dan gen supresor tumor (Silalahi, 2006). Tumor adalah penyakit kompleks dari berbagai akumulasi mutasi genetik yang manifestasi penyakitnya memerlukan waktu yang lama. Hal inilah yang menyebabkan keterbatasan efektivitas kemoterapi tumor. Fenomena ini akan meningkatkan jumlah kematian (Flora dan Ferguson, 2005). Perbedaan pokok antara sel normal dan sel kanker yang teridentifikasi bahwa sel normal usianya terbatas, sedangkan sel kanker adalah *immortal*. Sel neoplastik tidak berkembang secara terintegrasi dan tidak ada ketergantungan pada populasi. Regulasi pada kontrol mitosis, diferensiasi, dan interaksi antarsel mengalami gangguan (Cambel dan Smith 2000; Cheville, 1999). Kerusakan oksidatif pada DNA akibat

radiasi, radikal bebas, dan senyawa oksigen yang bersifat oksidatif merupakan penyebab terpenting kanker (Silalahi, 2006).

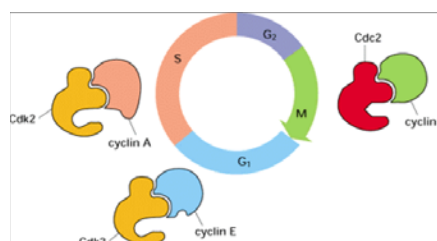
#### D. Kanker Payudara

Pada tahun 2002 kanker payudara merupakan kanker yang paling umum menyerang wanita di Indonesia, dan pada tahun 2005 merupakan penyebab kematian utama pada wanita di Indonesia. Penyebab kanker payudara adalah pola hidup, lingkungan dan faktor genetik. Pola hidup antara lain banyak makanan berlemak, alkohol dan sedikit konsumsi buah dan sayur. Selain itu riwayat keluarga yang positif menderita kanker payudara memiliki risiko yang tinggi (<http://www.who.int/infobase/cancer.aspx>).

Pada kanker payudara terjadi upregulasi aktivasi *ligand-dependent estrogen reseptor* (ER) yang mengakibatkan resistensi anti-estrogen. Beberapa perubahan pada kanker payudara adalah upregulasi dan regulasi abnormal jalur factor pertumbuhan (EGFR, IGFR, HER2) dan molekul signal transduksi intraselular (Ras, Raf, MAPK, Akt). Faktor pertumbuhan seperti IGF dan EGF dapat mengaktivasi ER dalam keadaan tersedia atau tidaknya estrogen melalui mekanisme fosforilasi estrogen reseptor (Rennie *et al.*, 2005). Sekitar 80% kasus kanker payudara diketahui terdapat overekspresi Bcl-2. Beberapa protein apoptosis inhibitor seperti XIAP, cIAP1, cIAP2, dan survivin juga merupakan biomarker kanker payudara (Parton *et al.*, 2001).

#### E. Daur Sel

Proliferasi sel diatur oleh molekul *checkpoint* pada setiap tahap daur sel. Daur sel meliputi suatu proses berantai yang mengakibatkan duplikasi DNA dan pembelahan sel. Empat fase utama pada daur sel adalah : fase gap 1 (G<sub>1</sub>), fase sintesis (S), fase gap 2 (G<sub>2</sub>), dan fase mitosis (M) (Gambar 2).



Gambar 2. Daur sel dan beberapa kompleks CDK/cyclin pengatur (Vermeulen *et al.*, 2003)

Fase G<sub>1</sub> adalah fase pada saat sel mempersiapkan diri untuk replikasi DNA yang akan terjadi pada fase S, jika sintesis DNA sudah lengkap sel kemudian memasuki fase G<sub>2</sub>, pada fase ini sel mempersiapkan diri untuk pembelahan sel. Sel yang berada pada fase G<sub>1</sub> dapat

memutuskan untuk masuk ke fase S atau masuk ke fase G0. Fase G0 adalah fase untuk *on-proliferating* sel (Lodish *et al.*, 2000, Vermeulen *et al.*, 2003).

Perpindahan dari satu fase ke fase berikutnya pada daur sel diatur oleh heterodimer protein kinase yang terdiri dari subunit katalitik yaitu *cyclin dependent kinase* (Cdk) dan subunit pengatur; *cyclin*. Ada beberapa jenis pengaturan aktivitas kompleks *Cdk-cyclin*, yaitu :

- (1) Regulasi Cdk oleh fosforilasi. Aktivasi Cdk memerlukan fosforilasi pada residu thr 161 untuk Cdk1 dan Thr 160 untuk Cdk2. Fosforilasi ini diperantarai oleh Cdk-activating kinase (CAK). Pada fase G2M fosforilasi oleh protein kinase Wee dan Myt 1 pada Thr 14 dan Tyr 15 menyebabkan kompleks tidak aktif, dan aktivasi terjadi melalui defosforilasi pada kedua asam amino tersebut oleh cdc25.
- (2) Aktivasi Cdk oleh pengikatan *cyclin*. Ketersediaan *cyclin* berubah-ubah selama perkembangan sel yang mengakibatkan tepatnya waktu aktivasi dan hanya aktif pada saat tertentu. Pada setiap fase daur sel terdapat beberapa *cyclin* yang berbeda-beda. *Cyclin* D1, D2, D3 mengikat Cdk 4 dan cdk 6, kompleks Cdk-Cyc D diperlukan untuk memasuki fase G1. *Cyclin* E mengikat cdk 2 yang mengatur perkembangan G1 memasuki fase S. *Cyclin* A mengikat Cdk 2 yang bekerja pada fase S. Pada fase G2 akhir dan awal fase M *cyclin* A membentuk kompleks dengan Cdk1 untuk memasuki fase M (Vermeulen *et al.*, 2003).
- (3) Inhibitor Cdk (CKI). Kontrol daur sel juga dipengaruhi oleh inhibitor Cdk (CKI), ada dua kelompok CKI : CIP (*Cdk inhibitory protein*) yang terdiri dari p21, p27, p57 dan INK4 (inhibitor kinase 4) yang meliputi p15, p16, p18, p19. Kelompok CIP mengikat dan menghambat kompleks Cdk1-, Cdk2-, Cdk4- dan *Cdk6-cyclin*, sedangkan INK4 mengikat dan menghambat kompleks *Cdk4-cyclin* D dan *Cdk6-cyclin* D (Lodish *et al.*, 2000, Donovan *et al.*, 2005).

Distribusi sel pada daur sel serta kinetika proliferasi sel dapat ditentukan dengan menggunakan *Flowcytometry*. Sel diwarnai dengan senyawa fluoresen pada molekul yang ditargetkan, reseptor permukaan sel, molekul yang terlibat dalam jalur *signaling*, dan protein yang terekspresi pada fase daur sel. Kemudian sel diarahkan pada berkas laser untuk mengeksitasi fluoresen, emisi fluoresen dikoleksi dan ditampilkan sebagai distribusi fluoresen. Sel dapat juga dipisahkan berdasarkan intensitas fluoresen (MacDonald and Ford, 1997, Freshney, 2000, Donovan *et al.*, 2005)

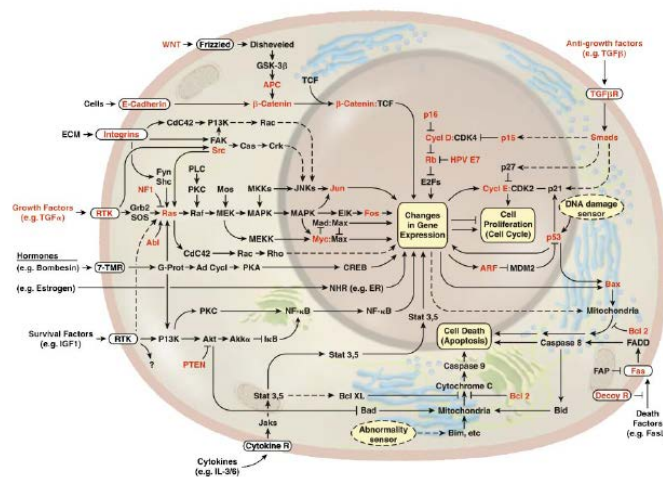
Senyawa fluoresen yang sering dipakai untuk pewarnaan DNA pada *flowcytometry* antara lain etidium bromida, propidium iodida, akridin oranye, dan Hoechst 33342. Setelah sel difiksasi senyawa fluoresen dapat memasuki sel dan berikatan dengan DNA sehingga intensitas fluoresen yang dihasilkan akan sebanding dengan jumlah DNA yang terdeteksi yang dapat merepresentasikan kondisi sel di dalam daur sel. Komputer akan menganalisis

distribusi DNA sesuai dengan kandungan DNA 2N dan kandungan DNA 4N serta kandungan DNA intermediat atau fase sintesis (S). Sel pada fase G1 memiliki kandungan DNA 2N sedangkan sel memasuki fase G2M memiliki kandungan DNA 4N sehingga sel yang berada pada G1 memiliki intensitas fluoresen lebih rendah dibanding sel yang berada pada G2M.

## F. Kematian Sel

Menurut para praktisi pengobatan Cina, terdapat beberapa kunci untuk mengembalikan pasien kanker kembali ke keadaan sehat, di mana terapi kanker difokuskan pada hubungan saling mempengaruhi antara induksi apoptosis/menahan siklus sel, penghambatan angiogenesis, menanggulangi resistensi penggunaan beberapa obat bersama, dan meningkatkan sistem imun. Proses yang menyebabkan apoptosis dimediasi oleh jalur ekstrinsik (melalui reseptor kematian) atau intrinsik (melalui mitokondria) (Parekh *et al.*, 2009).

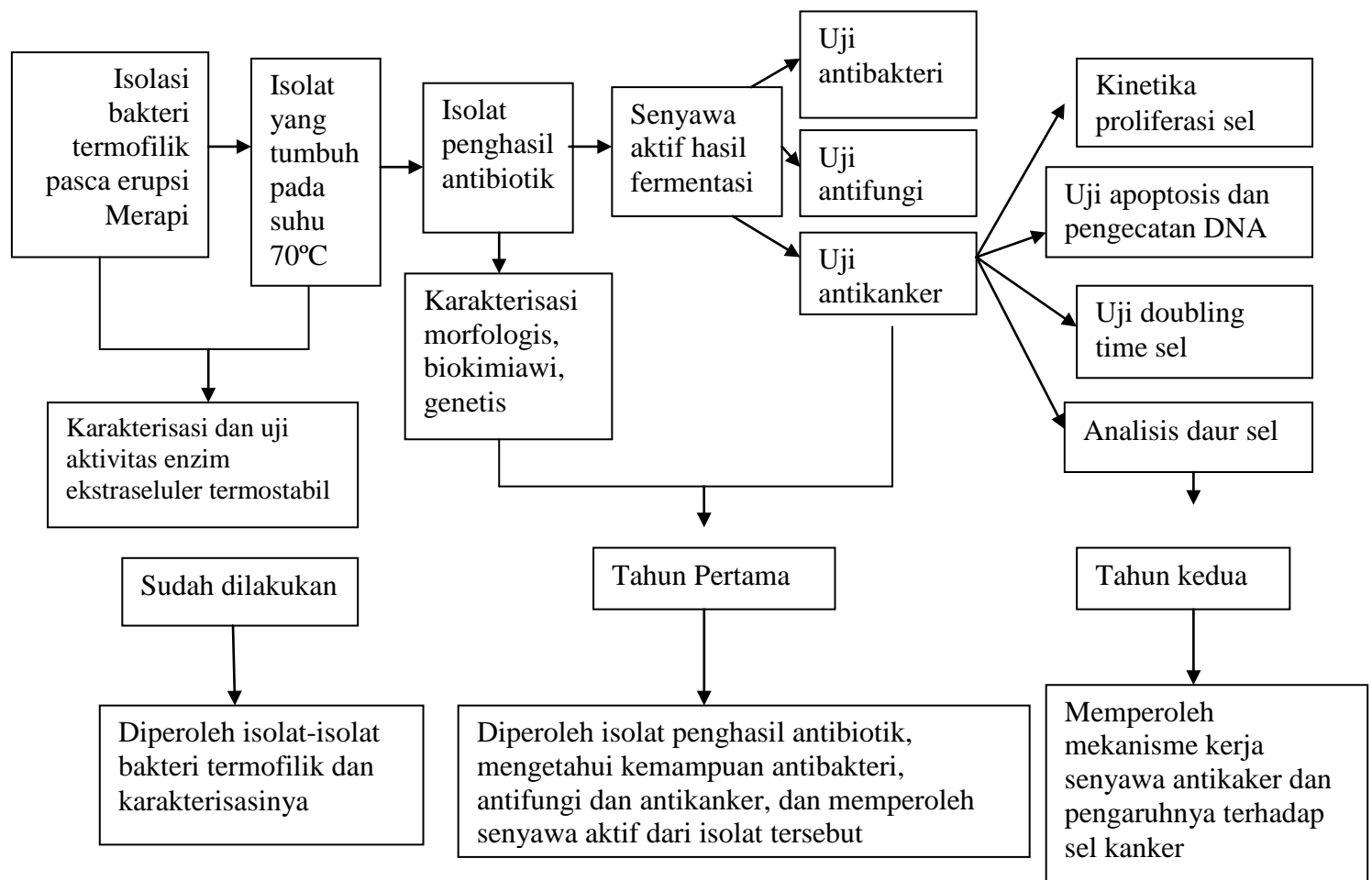
Apoptosis dipandu oleh sejumlah langkah yang kompleks, program multi jalur yang berakhir pada pemecahan DNA sel yang menyebabkan kematian sel. Kaskade kejadian intraseluler yang menyebabkan kematian sel telah diidentifikasi dan melibatkan aktivasi atau penekanan sejumlah reseptor, gena, atau enzim kunci. Mitokondria, sumber energi sel diketahui memegang peranan penting dalam mendukung kelangsungan hidup sel dan beberapa pemicu apoptosis diketahui bekerja di sini, baik secara langsung maupun tidak langsung (Parekh *et al.*, 2009)



Gambar 3. Mekanisme *signaling* di dalam sel

Sebelumnya, peneliti telah berhasil mengisolasi beberapa isolat bakteri termofilik pasca erupsi Merapi. Hasil isolasi bakteri dari sampel pasir dan air sungai Gendol didapatkan 538 isolat. Dari keseluruhan isolat, terdapat 253 isolat yang dapat ditumbuhkan sampai suhu

70°C (Rakhmawati dan Yulianti, 2011). Isolat tersebut sudah dilakukan karakterisasi morfologis dan biokimiawi untuk isolat-isolat yang mampu menghasilkan enzim ekstraseluler, antara lain amilase, lipase, selulase dan protease (Rakhmawati dan Yulianti, (2011), serta telah dilakukan uji aktivitas enzim amilase termostabil (Yulianti dan Rakhmawati, (2011), dan uji aktivitas enzim lipase termostabil (Pramiadi, Yulianti dan Rakhmawati (2012).



Gambar 4. Roadmap Penelitian

### **BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN**

#### **A. Tujuan Penelitian**

Tujuan umum dari penelitian tahun pertama ini adalah untuk melihat aktivitas antibakteri, antifungi dan antikanker dari protein dan cell free extract yang diperoleh dari fermentasi bakteri termofilik.

Tujuan khusus dari penelitian pada tahun pertama adalah:

1. Memperoleh isolat bakteri yang menghasilkan *Cationic Antimicrobial Peptides* (AMPs)
2. Mengetahui karakter morfologis, kimiawi bakteri termofilik penghasil AMP
3. Mengetahui efek sitotoksik protein terhadap sel kanker T47D.
4. Mengetahui potensi antibakteri protein dan cell free extract terhadap bakteri pathogen
5. Mengetahui potensi antifungi protein dan cell free extract terhadap fungi pathogen

#### **B. Manfaat Penelitian**

Dari penelitian tahun pertama ini diharapkan dapat ditemukan isolat bakteri termofilik yang mampu menghasilkan senyawa yang memiliki potensi sebagai antimikrobia dan anti kanker, yang dalam hal ini adalah proteinnya, sehingga untuk penelitian selanjutnya dapat dikembangkan protein yang bisa digunakan sebagai agen antimikrobia yang baru, baik sebagai antibakteri maupun antifungi dan agen antikanker. Bagi perkembangan ilmu, diharapkan akan dikembangkan senyawa antikanker dan antimikrobia baru yang lebih berpotensi dan bersifat lebih aman. Isolat yang mampu menghasilkan protein yang bersifat antimikrobia dan antikanker ini kemudian diidentifikasi dan dikarakterisasi, sehingga dengan ditemukannya isolat dengan karakter yang berbeda dengan isolat bakteri yang sudah ada, maka akan diperoleh isolat baru yang berpotensi menghasilkan protein yang bersifat antimikrobia dan antikanker.

## **BAB IV METODE PENELITIAN**

### **Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksplorasi dan eksperimental

### **Objek Penelitian**

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan bakteri termofilik yang diisolasi dari air dan pasir sungai Gendol Merapi sebagai objek penelitian.

### **Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini direncanakan akan dilakukan selama 2 tahun. Pada tahun pertama, waktu penelitian adalah selama 5 bulan dan dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi FMIPA UNY, Laboratorium Bioteknologi PAU UGM, dan Laboratorium Kultur Sel bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM

### **Alat dan Bahan**

Alat dan Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : isolat bakteri termofilik, Medium NB, NA, PDA, PD Broth, Dimethyl Sulfoxide (DMSO), aquades, metanol, sel kanker payudara T47D, fetal bovine serum (FBS) 10%, Fungizone 0,5%, Penstrep 2%, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), SDS 10% dalam HCl 0,01N, Phosphate Buffer Saline (PBS), tripsin, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), akridin oranye/etidium bromida (100 µg/ml akridin oranye (bio-Rad) dalam PBS dan 100 µg/ml etidium bromida (bio-Rad) dalam PBS), poliakrilamid, SDS, marker protein, ammonium sulfat, glukosa 1%, fruktosa 1%, galaktosa 1%, laktosa 1%, sukrosa 1%, amilum 1%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, medium SIM, safranin, alkohol 70%, fenolftalein, LAF, botol Flash kultur, tabung konikel, pipet tetes, mikropipet, blue tip, tissue, tabung erlenmeyer, inkubator, mikroskop inverted, hemositometer, *96 well plate*, timbangan analitik, ELISA reader, inkubator CO<sub>2</sub>, *Cover slip* (Nunc), microplate 96 sumuran,.

### **Langkah Penelitian**

#### **Identifikasi koloni.**

Isolat diidentifikasi berdasarkan morfologi dan tes biokimiawi. Karakterisasi yang dilakukan berdasarkan Bergey's Manual of Determinative Bacteriology dan tes yang dilakukan antara lain indole production test, catalase test, dan carbohydrate fermentation test, motilitas, morfologi koloni dan sel, kebutuhan terhadap O<sub>2</sub> dan pengecatan gram (Bergey and Holt, 1994).

## **Produksi Antibiotik**

### ***Persipan Inokulum***

Inokulum disiapkan pada medium Nutrien Broth. 100 ml. Media disiapkan dalam erlenmeyer 250ml dan diautoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi selama 15 menit, bakteri termofilik ditumbuhkan pada nutrient agar miring dan diinkubasi pada suhu 55°C selama 24 jam. Reisolasi dilakukan untuk membuat kultur baru dengan menggunakan ose steril dan inkubasi dilakukan lagi pada 55°C selama 24 jam. Dari NA diambil 1 ose dan dipindahkan ke medium NB.

### ***Batch fermentation***

Medium NB ditambah 1% glukosa dalam 1,5 liter akuades digunakan sebagai medium produksi. Medium yang sudah disterilisasi (200ml) dimasukkan dalam Erlenmeyer 250ml. Inokulum (10%) dimasukkan dalam erlenmeyer. Dan diinkubasi lagi pada suhu 55°C. Setelah 24 jam, sampel dimasukkan tabung konikel 15 mL, disentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 3.000 rpm untuk memperoleh supernatant yang tidak mengandung sel.

### **Pemurnian dan Isolasi Protein**

Supernatan selanjutnya diendapkan proteinnya dengan menggunakan ammonium sulfat 60% yang dilanjutkan dengan dialisis untuk menghilangkan sisa ammonium sulfat. Protein dilihat profilnya dengan menggunakan SDS PAGE

### **Uji Antimikrobia dan antikanker**

#### **1. Uji antijamur**

Cell free extract dan protein dari masing-masing perlakuan diencerkan secara bertingkat sehingga konsentrasinya adalah 100%, 80%, 60%, 40% dan 20%. Kemudian masing-masing diambil 10 µl lalu ditetaskan pada paper disk dengan diameter 5 mm. PDA steril (20 ml) dibiarkan mengeras kemudian diinokulasi dengan 100 µl bibit jamur *Candida albicans* dan didiamkan selama 30-60 menit. Setelah itu dimasukkan keping paper disk yang telah diberi cell free extract dan protein. Diameter penghambatan di sekitar keping paper disk diukur setelah 24 jam pada suhu 37°C.

#### **2. Uji antibakteri**

Cell free extract dan protein dari masing-masing perlakuan diencerkan secara bertingkat sehingga konsentrasinya adalah 100%, 80%, 60%, 40% dan 20%. Kemudian masing-masing diambil sekitar 10 µl lalu ditetaskan pada paper disk dengan diameter 5 mm. NA steril (20 ml) dibiarkan mengeras kemudian diinokulasi dengan 100 µl bibit bakteri *E coli* dan *Staphylococcus aureus* dan didiamkan selama 30-60 menit. Setelah itu dimasukkan keping



paper disk yang telah diberi cell free extract dan protein. Diameter penghambatan di sekitar keping paper disk diukur setelah 24 jam pada suhu 37°C

### 3. Uji antikanker

Ekstrak diencerkan sampai konsentrasinya 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%. Selanjutnya diujikan pada sel kanker T47D. Data yang diperoleh dihitung IC<sub>50</sub>nya

## **Pengujian pada kultur sel**

### Membuat media

Dimasukkan 10% FBS, 0,5 % Fungizone, 2 % Penstrep dan DMEM sampai 100 mL ke dalam botol steril.

#### 1. Memanen sel

Media dalam flash kultur diambil dengan pipet tetes sampai habis, kemudian dicuci dengan PBS. Setelah PBS dibuang, ditambah dengan  $\pm 700 \mu\text{L}$  tripsin dan dimasukkan ke dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 5-10 menit. Kemudian diperiksa di bawah mikroskop inverted untuk mengetahui apakah sel sudah terlepas. Setelah itu dimasukkan media dan diresuspensi dengan cara dipipet berulang-ulang dengan hati-hati dan ditampung dalam konikel 15 mL. Diambil sebanyak 10  $\mu\text{L}$  untuk dihitung jumlah selnya dengan hemositometer. Dari hasil perhitungan tersebut, diperlukan  $1 \times 10^4 / 100 \mu\text{L}$  sel untuk masing-masing well untuk pengujian. Sel untuk uji dimasukkan dalam *96 well plate*. Plate ini kemudian diinkubasi pada temperatur 37°C selama 24 jam.

#### 2. Uji sitotoksik

Uji sitotoksik dilakukan dengan menambahkan kadar ekstrak yang telah ditentukan, sebanyak 100 $\mu\text{L}$  tiap well. Kemudian diinkubasi pada inkubator 37°C selama 24 jam.

#### 3. Penghitungan sel dengan metode MTT.

Setelah inkubasi cukup, media dibuang dan ditambah media baru 100 $\mu\text{L}$  per well dan ditambahkan MTT 5 mg/mL sebanyak 10  $\mu\text{L}$  per well. Kemudian diinkubasi 4-6 jam. Reaksi MTT dihentikan dengan cara memberikan stoper berupa SDS 10% dalam HCl 0,01N sebanyak 100 $\mu\text{L}$  tiap well. Selanjutnya dilakukan inkubasi semalam.

#### 4. Pembacaan hasil

Pembacaan dilakukan dengan Elisa reader pada panjang gelombang 595 nm.

Viabilitas sel dihitung dengan rumus sebagai berikut (Mosmann, 1983):

$$\% \text{ Sel hidup} = (\text{abs P} - \text{abs M}) / (\text{abs K} - \text{abs M}) \times 100\%.$$

Abs P = absorbansi sel dengan perlakuan

Abs M = absorbansi kontrol media

Abs K = absorbansi kontrol sel

## BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

### A. Hasil

Penelitian dimulai dari bulan Juli yang dimulai dari kegiatan melihat kembali isolat-isolat bakteri termofilik yang diisolasi dari kali Gendol atas pada saat erupsi Merapi tahun 2010. Terdapat 83 isolat yang masih dalam kondisi baik (masih ada isolat, media belum kering dan tidak ada kontaminasi). Semua isolat yang ada diaktifkan kembali dengan cara menumbuhkan isolat-isolat tersebut pada media NA dengan cara streak agar dan diinkubasi pada suhu 55°C sesuai dengan suhu pada saat bakteri tersebut diambil dari kali Gendol atas. Setelah 24 jam, beberapa isolat ada yang tumbuh menjadi 2-3 koloni dengan karakter yang berbeda. Isolat yang tumbuh dalam waktu 24 jam sebanyak 38 isolat, 48 jam sebanyak 24 isolat, isolat yang tumbuh 72 jam sebanyak 20 isolat, dan isolat yang tumbuh 96 jam sebanyak 8 isolat. Sisa isolat sebanyak 12 isolat ditumbuhkan pada media NB. Isolat-isolat yang tumbuh, sebanyak 102 isolat kemudian diaktifkan kembali pada media NA miring, setelah 24 jam, isolat dipindah ke medium NA plate dan diinkubasi pada suhu 70°C. Isolat-isolat yang dapat tumbuh pada suhu tersebut sebanyak 11 isolat yaitu isolat D2, D94b, D92, D153, D110a, D104c, D43a, D113, D132b, D112 dan D83. Kemudian 102 isolat ditumbuhkan pada medium NA plate dan diinkubasi pada suhu 37°C. Pada suhu ini hampir semua isolat tumbuh, kecuali isolat D123a, D92, D2. Pada penelitian ini yang digunakan adalah isolat yang dapat tumbuh pada suhu 70°C dan 37°C karena untuk menguji sifat antimikrobia, isolat akan diinkubasi pada suhu 37°C. Sehingga isolat yang digunakan adalah isolat D94b, D153, D110a, D104c, D43a, D113, D132b, D112 dan D83. Isolat-isolat tersebut kemudian ditumbuhkan lagi untuk diaktifkan. Dari 9 isolat hanya ada 7 isolat yang dapat tumbuh. Untuk uji pendahuluan, 7 isolat ini diuji aktivitas antimikrobianya terhadap bakteri patogen *E. Coli* dan *Staphylococcus aureus* dan jamur patogen *Tricophyton mentagrophytes* dan *Candida albican* dan dilakukan karakterisasi.

Tabel 1. Data hasil reisolasi isolat bakteri termofilik

	Tumbuh 24 jam	Tumbuh 48 jam	Tumbuh 72 jam	Tumbuh 96 jam	Lebih dari 96 jam	Tumbuh 55°C	Tumbuh 70°C	Tumbuh 37°C
Jumlah isolat	38	24	20	8	12	102	11	99

Dari tabel di atas tampak bahwa terdapat 11 isolat yang dapat tumbuh sampai suhu 70°C, namun setelah dilakukan inkubasi pada suhu 37°C, hanya 9 isolat yang dapat tumbuh. Setelah dilakukan penanaman berulang-ulang, hanya terdapat 7 isolat yang dapat ditumbuhkan pada medium NA dan NB, sehingga hanya 7 isolat itulah yang digunakan untuk uji selanjutnya. Selanjutnya 7 isolat tersebut dikarakterisasi morfologi koloni, sel dan uji biokimiawi. Yang ditunjukkan pada Tabel 2 dan Tabel 3.

Tabel 2. Hasil karakterisasi morfologi koloni

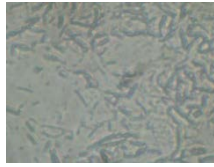
No	Kode isolat	Warna	Ukuran				Tepi	Bentuk	Elevasi
			pinpoint	kecil	sedang	besar			
1.	D83	kuning		√			entire	sirkuler	rata
2.	D94b	kuning				√	wavy	irreguler	rata
3.	D104c	Putih susu		√			entire	sirkuler	rata
4.	D110	kuning		√			entire	sirkuler	rata
5.	D113	Putih susu		√			wavy	irreguler	konvex
6.	D132b	Putih susu		√			wavy	irreguler	rata
7.	D153	Putih susu	√				entire	sirkuler	rata

Hasil yang diperoleh dari tabel 2 menunjukkan bahwa koloni yang diperoleh memiliki karakter yang berbeda-beda. Demikian juga dengan karakterisasi morfologi selnya.

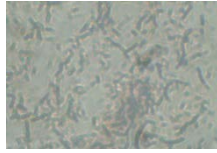
Tabel 3. Hasil karakterisasi morfologi dan biokimia sel

Isolat	Kebu- tuhan O <sub>2</sub>	Pro- duksi H <sub>2</sub> S	Moti- litas	Pola pertumb	F. Malt	F. Gal	F. Fruk	F. Sukr	F. Glu	F. Lak	Gram	Kata- lase	Bentuk sel	
D 104c	aerob	+	motil	pellicle	+	-	+	-	+	-	+	+	batang	mono
D 83	aerob	+	motil	pellicle	+	+	-	-	+	-	+	+	batang	mono
D 153	aerob	+	motil	pellicle	-	+	+	+	+	-	-	+	batang pendek	mono
D 94b	aerob	+	motil	pellicle	+	+	+	-	+	+	+	+	coccus	tetrad
D 110a	aerob	+	motil	pellicle	+	+	+	-	+	-	-	+	batang	mono
D 113	aerob	+	motil	pellicle	+	+	+	-	+	-	+	+	batang	mono
D 132b	anaerob	+	motil	sediment	-	+	+	+	+	-	+	+	batang	mono

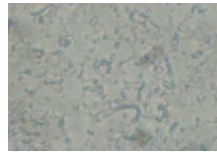
Dari tabel tersebut tampak bahwa 7 isolat yang diperoleh memiliki sifat biokimiawi, fisiologi dan morfologi yang berbeda-beda. Memiliki sifat motilitas yang sama, yaitu motil dan semuanya dapat menghasilkan H<sub>2</sub>S. Berikut ini adalah gambar sel dari 7 isolat yang sudah dikarakterisasi.



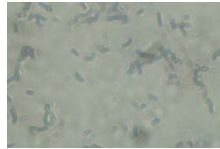
Gambar 5. Isolat D110a dengan perbesaran 400x



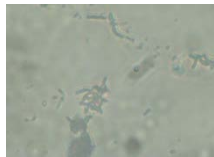
Gambar 6. Isolat D83 dengan perbesaran 400x



Gambar 7. Isolat D104c dengan perbesaran 400x



Gambar 8. Isolat D113 dengan perbesaran 400x



Gambar 9. Isolat D132 dengan perbesaran 400x



Gambar 10. Isolat D94b dengan perbesaran 400x



Gambar 11. Isolat D153 dengan perbesaran 400x

Tujuh isolat ini yang diseleksi lebih lanjut potensinya sebagai antimikrobia, yaitu bakteri pathogen *E. Coli* dan *Staphylococcus aureus* dan jamur pathogen *Tricophyton mentagrophytes* dan *Candida albican*. Hasil uji antimikrobia koloni ketujuh isolat dapat dilihat pada tabel 4 berikut ini.

Tabel 4. Hasil uji antibakteri dan antijamur ketujuh isolat

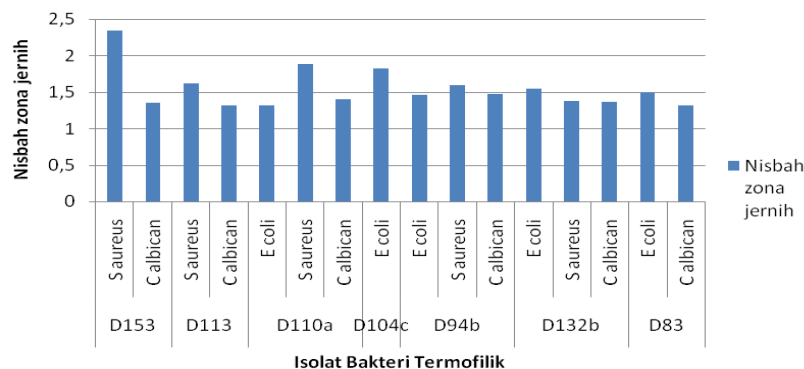
Isolat	D83	D94b	D104c	D110	D113	D132b	D153
<i>E coli</i>	+	+	+	+	-	+	-
<i>S aureus</i>	-	+	-	+	+	+	+
<i>C albican</i>	+	+	-	+	+	+	+
<i>T mentagrophytes</i>	-	-	-	-	-	-	-

Dari tabel tersebut, tampak bahwa aktivitas antimikrobia yang ditunjukkan oleh koloni masing-masing isolat adalah berbeda. Isolat D83 hanya positif terhadap *E coli* dan *C albican*. Isolat D94 positif terhadap *E. Coli* dan *Staphylococcus aureus* dan jamur patogen *Candida albican*. Isolat D104c hanya positif terhadap *E. Coli*. Isolat D110 positif terhadap *E. Coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Candida albican*. Isolat D113 hanya positif terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Candida albican*. Isolat D132b positif terhadap *E. Coli* dan *Staphylococcus aureus* dan jamur patogen *Candida albican*. Isolat D153 hanya positif terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Candida albican*. Dari hasil tersebut tampak bahwa ketujuh koloni isolat tidak memiliki sifat antifungi terhadap *Tricophyton mentagrophytes*. Sehingga untuk uji selanjutnya tidak menggunakan fungi ini sebagai mikroba uji. Hasil uji aktivitas antibakteri ketujuh isolat ditampilkan pada tabel berikut ini

Tabel 5. Hasil uji aktivitas antibakteri dan antifungi koloni ketujuh isolat

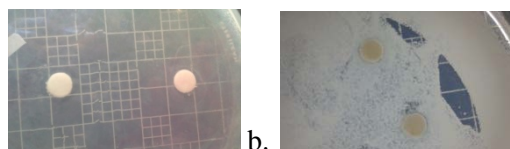
Isolat	Bakteri /jamur Patogen	Rerata diameter zona jernih (Cm)	Rerata diameter koloni (Cm)	Nisbah zona jernih
D153	<i>S aureus</i>	1,17	0,5	2,34
	<i>C albican</i>	0,724167	0,5375	1,347287
D113	<i>S aureus</i>	1,080833	0,67	1,613184
	<i>C albican</i>	0,658333	0,5	1,316667
D110a	<i>E coli</i>	0,883333	0,673333	1,311881
	<i>S aureus</i>	0,945	0,5	1,89
	<i>C albican</i>	0,699167	0,5	1,398333
D104c	<i>E coli</i>	0,909167	0,5	1,818333
D94b	<i>E coli</i>	0,733333	0,5	1,466667
	<i>S aureus</i>	0,795	0,5	1,59
	<i>C albican</i>	0,735	0,5	1,47
D132b	<i>E coli</i>	0,773333	0,5	1,546667
	<i>S aureus</i>	0,685833	0,5	1,371667
	<i>C albican</i>	0,683333	0,5	1,366667
D83	<i>E coli</i>	0,745833	0,5	1,491667
	<i>C albican</i>	0,658333	0,5	1,316667

Dari tabel tersebut tampak bahwa nisbah zona jernih terbesar diperoleh dari koloni isolat D153 terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus* yaitu sebesar 2,34. Besar nisbah zona jernih yang dihasilkan oleh koloni ketujuh isolat terhadap mikrobial uji, ditunjukkan pada gambar 12 berikut ini.

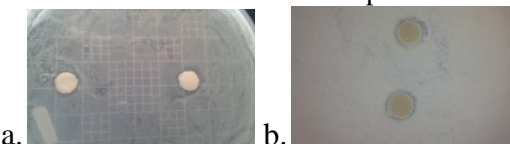


Gambar 12. Nisbah zona jernih masing-masing bakteri termofilik terhadap mikrobial uji.

Hasil yang diperoleh pada gambar 12 tersebut berdasarkan perhitungan pembagian diameter zona jernih dengan diameter koloni yang gambarnya dapat dilihat pada gambar 13-19 berikut ini. .



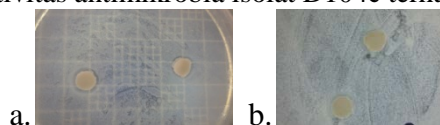
Gambar 13. Uji aktivitas antimikrobia isolat D83 terhadap a. *Escherichia coli* b. *Candida albican*



Gambar 14. Uji aktivitas antimikrobia isolat D94b terhadap a. *Staphylococcus aureus* b. *Candida albican*



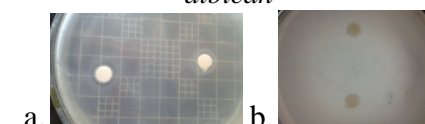
Gambar 15. Uji aktivitas antimikrobia isolat D104c terhadap *Escherichia coli*



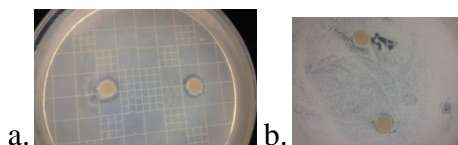
Gambar 16. Uji aktivitas antimikrobia isolat D110a terhadap a. *Staphylococcus aureus* b. *Candida albican*



Gambar 17. Uji aktivitas antimikrobia isolat D113 terhadap a. *Staphylococcus aureus* b. *Candida albican*



Gambar 18. Uji aktivitas antimikrobia isolat D132b terhadap a. *Escherichia coli* b. *Candida albican*



Gambar 19. Uji aktivitas antimikrobia isolat D153 terhadap a. *Staphylococcus aureus* b. *Candida albican*

Selanjutnya 7 isolat tersebut ditanam pada medium fermentasi yaitu NB dengan 1% glukosa dan diinkubasi pada suhu 55°C selama 24 jam. Dari hasil fermentasi, hanya ada 6 isolat yang dapat tumbuh, yaitu D94b, D153, D110a, D104c, D113, dan D83. Hasil fermentasi disentrifugasi sehingga memperoleh cell free extract, yang sebagian disimpan dan sebagian diendapkan proteinnya dengan ammonium sulfat untuk pengujian selanjutnya. Cell free extract dan protein yang dihasilkan diujikan lagi pada bakteri uji *E. Coli* dan *Staphylococcus aureus* dan fungi uji *Candida albican*.

Tabel 6. Hasil Uji antimikrobia protein dan cell free extract hasil fermentasi 6 isolat

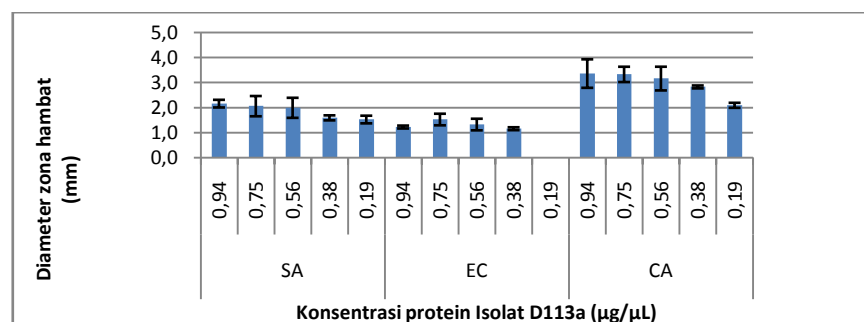
Isolat	Patogen	Konst prot (µg/µl)	stdev	rata2 diameter zona jernih (mm)	diameter zona hambat (mm)	Konst cfe (%)	stdev	rata2 diameter zona jernih (mm)	diameter zona hambat (mm)
113a	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,94	0,2	7,2	2,2	100	0,3	7,5	2,5
		0,75	0,4	7,1	2,1	80	0,2	7,2	2,2
		0,56	0,4	7,0	2,0	60	0,4	7,3	2,3
		0,38	0,1	6,6	1,6	40	0,4	7,0	2,0
		0,19	0,2	6,5	1,5	20	0,3	7,1	2,1
	<i>Eschericia coli</i>	0,94	0,1	6,2	1,2	100	0,1	6,1	1,1
		0,75	0,2	6,5	1,5	80	0,1	6,1	1,1
		0,56	0,2	6,3	1,3	60	0,1	6,3	1,3
		0,38	0,1	6,2	1,2	40	0,1	6,3	1,3
		0,19				20			
	<i>Candida albican</i>	0,94	0,6	8,4	3,4	100	0,8	8,3	3,3
		0,75	0,3	8,3	3,3	80	0,2	7,8	2,8
		0,56	0,5	8,2	3,2	60	0,2	7,4	2,4
		0,38	0,1	7,8	2,8	40	0,4	7,4	2,4
		0,19	0,1	7,1	2,1	20	0,2	6,7	1,7
94b	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,85	0,2	7,2	2,2	100	0,2	7,0	2,0
		0,68	0,1	6,9	1,9	80	0,2	6,6	1,6
		0,51	0,2	7,0	2,0	60	0,2	6,4	1,4
		0,34	0,3	6,7	1,7	40	0,3	6,4	1,4
		0,17	0,1	6,5	1,5	20	0,1	6,2	1,2
	<i>Eschericia coli</i>	0,85	0,2	8,0	3,0	100	0,2	7,5	2,5
		0,68				80	0,2	9,4	4,4
		0,51				60			
		0,34				40			

		0,17				20			
	<i>Candida albican</i>	0,85	0,6	8,8	3,8	100	0,2	9,6	4,6
		0,68	0,1	8,7	3,7	80	0,2	8,5	3,5
		0,51	0,1	7,7	2,7	60	0,4	8,3	3,3
		0,34	0,1	7,0	2,0	40	1,0	7,7	2,7
		0,17	0,3	7,0	2,0	20	0,3	7,5	2,5
153	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,67	0,3	7,2	2,2	100	0,3	6,9	1,9
		0,54	0,4	6,6	1,6	80	0,1	6,5	1,5
		0,4	0,6	7,4	2,4	60	0,3	6,4	1,4
		0,27	0,1	7,1	2,1	40	0,2	6,2	1,2
		0,13	0,1	6,6	1,6	20	0,0	6,0	1,0
	<i>Eschericia coli</i>	0,67	0,1	6,9	1,9	100	0,2	7,7	2,7
		0,54	0,1	7,4	2,4	80	0,3	8,9	3,9
		0,4	0,1	7,9	2,9	60	0,2	8,4	3,4
		0,27	0,3	9,7	4,7	40	0,2	7,6	2,6
		0,13	0,3	8,0	3,0	20	0,2	7,1	2,1
	<i>Candida albican</i>	0,67	0,1	9,9	4,9	100	0,2	9,4	4,4
		0,54	0,5	9,2	4,2	80	0,2	9,3	4,3
		0,4	0,3	8,5	3,5	60	0,1	9,3	4,3
		0,27	0,2	8,2	3,2	40	0,1	10,1	5,1
		0,13	0,6	8,0	3,0	20	0,4	9,2	4,2
104c	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,33	0,1	7,3	2,3	100	0,2	9,9	4,9
		0,26	0,1	7,3	2,3	80	0,3	7,8	2,8
		0,19	0,1	7,4	2,4	60	0,3	7,2	2,2
		0,13	0,3	7,2	2,2	40	0,1	7,2	2,2
		0,07	0,2	7,0	2,0	20	0,5	7,2	2,2
	<i>Eschericia coli</i>	0,33				100	0,2	7,3	2,3
		0,26				80	0,2	7,4	2,4
		0,19				60	0,2	7,2	2,2
		0,13				40	0,1	7,2	2,2
		0,07				20			
	<i>Candida albican</i>	0,33	0,2	8,2	3,2	100	0,1	9,6	4,6
		0,26	0,4	8,1	3,1	80	0,1	8,5	3,5
		0,19	0,3	7,6	2,6	60	0,3	7,4	2,4
		0,13	0,1	7,1	2,1	40	0,2	7,2	2,2
		0,07	0,1	6,4	1,4	20	0,8	7,2	2,2
83	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,63	0,2	6,3	1,3	100	0,3	7,3	2,3
		0,5	0,1	7,5	2,5	80	0,3	6,7	1,7
		0,38	0,3	6,7	1,7	60	0,2	6,4	1,4
		0,25	0,1	6,6	1,6	40	0,1	6,1	1,1
		0,13	0,2	6,4	1,4	20	0,1	6,1	1,1
	<i>Eschericia coli</i>	0,63				100	0,2	6,7	1,7
		0,5				80			
		0,38				60			
		0,25				40			



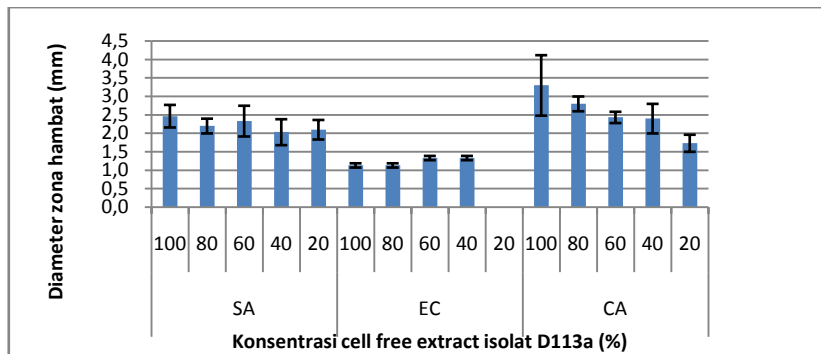
		0,13				20			
	<i>Candida albican</i>	0,63	0,3	8,7	3,7	100	1,2	9,3	4,3
		0,5	0,3	7,4	2,4	80	0,1	9,6	4,6
		0,38	0,7	7,2	2,2	60	0,1	9,1	4,1
		0,25	0,1	6,9	1,9	40	0,5	7,5	2,5
		0,13	0,1	6,7	1,7	20	0,2	6,8	1,8
110a	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,77	0,5	8,9	3,9	100	0,3	9,3	4,3
		0,62	0,5	8,9	3,9	80	0,2	8,9	3,9
		0,46	0,5	8,8	3,8	60	0,4	8,3	3,3
		0,3	0,1	8,6	3,6	40	0,5	8,1	3,1
		0,15	0,4	8,3	3,3	20	0,1	7,9	2,9
	<i>Eschericia coli</i>	0,77	0,4	8,2	3,2	100	0,2	9,0	4,0
		0,62				80	0,3	7,3	2,3
		0,46				60	0,2	7,2	2,2
		0,3				40	0,1	6,5	1,5
		0,15				20			
	<i>Candida albican</i>	0,77	0,4	7,8	2,8	100	0,2	7,8	2,8
		0,62	0,3	8,1	3,1	80	0,2	7,8	2,8
		0,46	0,1	7,6	2,6	60	0,4	7,9	2,9
		0,3	0,3	7,7	2,7	40	0,2	7,5	2,5
		0,15	0,2	7,4	2,4	20	0,2	7,0	2,0

Data tersebut menunjukkan bahwa protein dan cell free extract yang diperoleh dari masing-masing isolat memiliki aktifitas antibakteri dan antifungi yang berbeda. Protein yang dihasilkan oleh isolat D83 dan D104c tidak memiliki kemampuan antibakteri terhadap *E coli*. Sedangkan protein dan cell free extract dari isolat yang lain mempunyai kemampuan antimikrobia meskipun dengan hasil diameter zona jernih yang berbeda. Hasil uji aktivitas cell free extract dan protein hasil fermentasi dari 6 isolat dapat dilihat pada gambar 20-31 berikut ini.



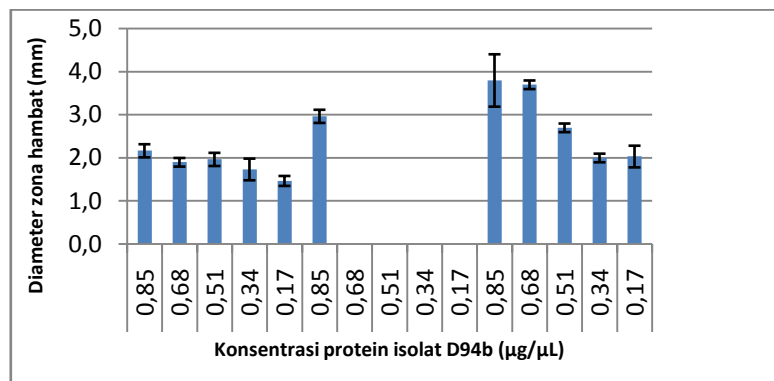
Gambar 20. Diameter zona hambat yang dihasilkan protein isolat D113a

Dari gambar tersebut tampak bahwa protein isolat D113a memiliki minimum inhibitory concentration (MIC) terhadap *S aureus* dan *C albican* sebesar 0,19 µg/µl dan terhadap *E coli* sebesar 0,38 µg/µl.



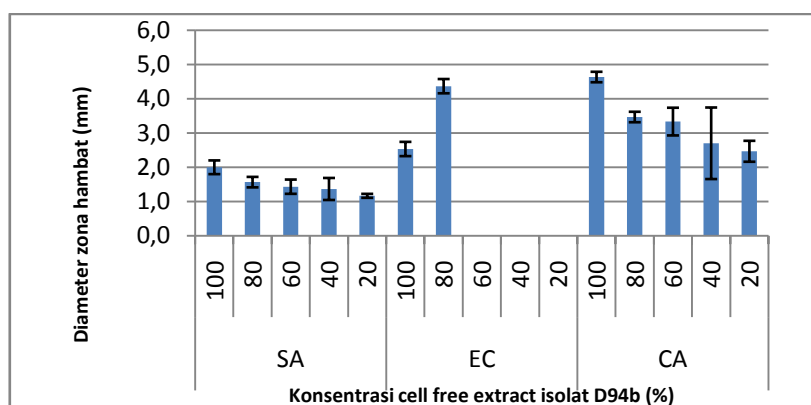
Gambar 21. Diameter zona hambat yang dihasilkan cell free extract isolat D113a

Dari gambar tersebut tampak bahwa cell free extract isolat D113a memiliki minimum inhibitory concentration (MIC) terhadap *S aureus* dan *C albican* sebesar 20% dan terhadap *E coli* sebesar 40%



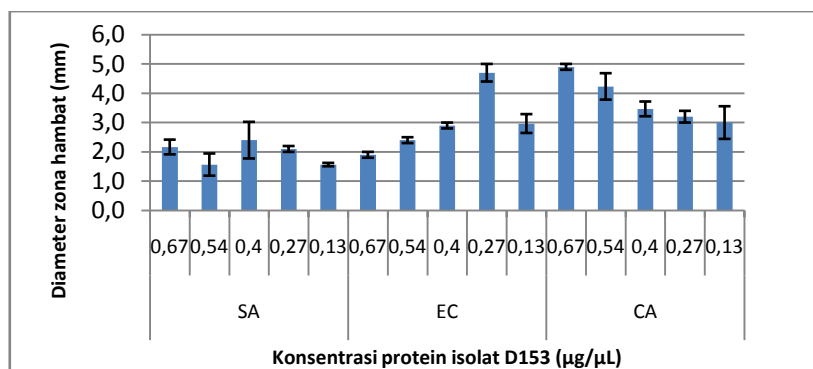
Gambar 22. Diameter zona hambat yang dihasilkan protein isolat D94b

Dari gambar tersebut tampak bahwa protein isolat D94b memiliki minimum inhibitory concentration (MIC) terhadap *S aureus* dan *C albican* sebesar 0,17 µg/µL dan terhadap *E coli* sebesar 0,85 µg/µL.



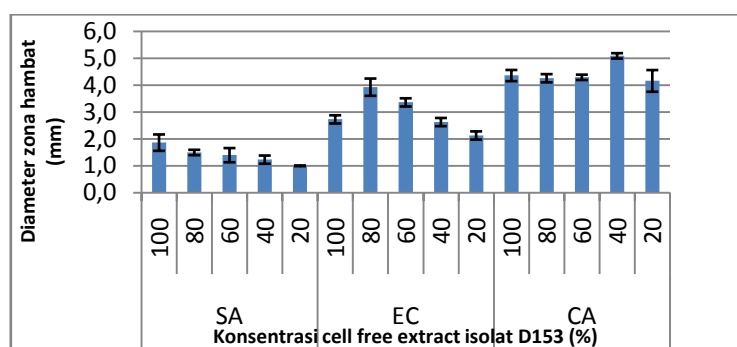
Gambar 23. Diameter zona hambat yang dihasilkan cell free extract isolat D94b

Dari gambar tersebut tampak bahwa cell free extract isolat D94b memiliki minimum inhibitory concentration (MIC) terhadap *S aureus* dan *C albican* sebesar 20% dan terhadap *E coli* sebesar 80%



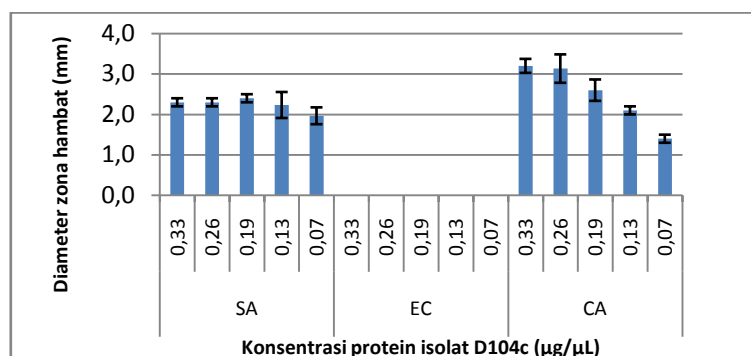
Gambar 24. Diameter zona hambat yang dihasilkan protein isolat D153

Dari gambar tersebut tampak bahwa protein isolat D153 memiliki minimum inhibitory concentration (MIC) terhadap *S aureus*, *E coli* dan *C albican* sebesar 0,13  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$



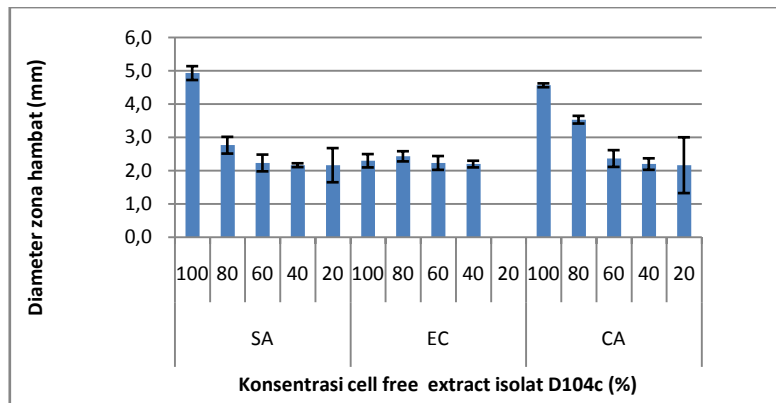
Gambar 25. Diameter zona hambat yang dihasilkan cell free extract isolat D153

Dari gambar tersebut tampak bahwa cell free extract isolat D153 memiliki minimum inhibitory concentration (MIC) terhadap *S aureus*, *E coli* dan *C albican* sebesar 20%



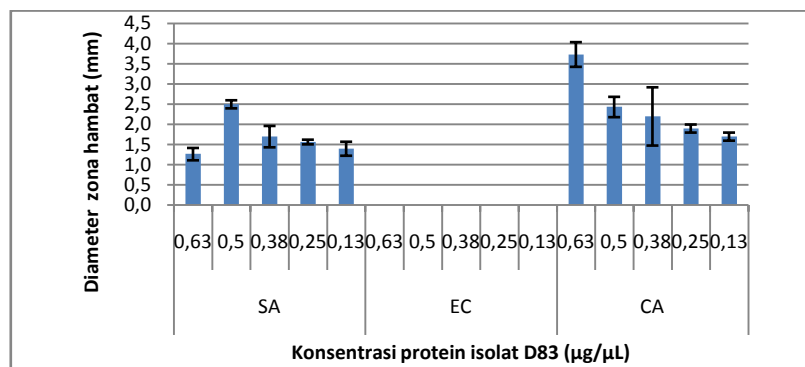
Gambar 26. Diameter zona hambat yang dihasilkan protein isolat D104c

Dari gambar tersebut tampak bahwa protein isolat D104c memiliki minimum inhibitory concentration (MIC) terhadap *S aureus* dan *C albican* sebesar 0,07  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  dan tidak berpotensi sebagai antibakteri terhadap *E coli* .



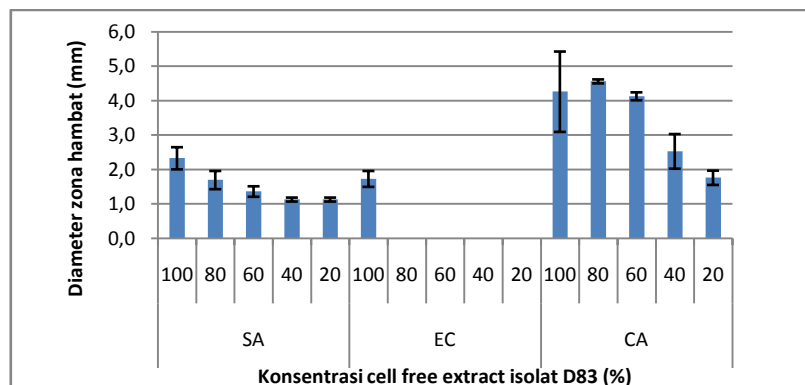
Gambar 27. Diameter zona hambat yang dihasilkan cell free extract isolat D104c

Dari gambar tersebut tampak bahwa cell free extract isolat D104c memiliki minimum inhibitory concentration (MIC) terhadap *S aureus* dan *C albican* sebesar 20% dan terhadap *E coli* sebesar 40%



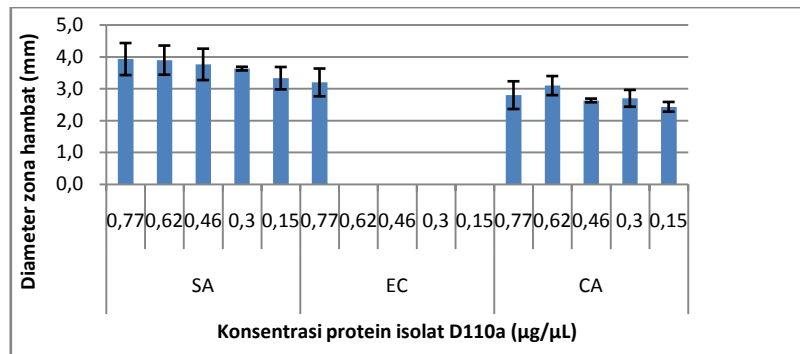
Gambar 28. Diameter zona hambat yang dihasilkan protein isolat D83

Dari gambar tersebut tampak bahwa protein isolat D83 memiliki minimum inhibitory concentration (MIC) terhadap *S aureus* dan *C albican* sebesar 0,13 µg/µl dan tidak berpotensi sebagai antibakteri terhadap *E coli*



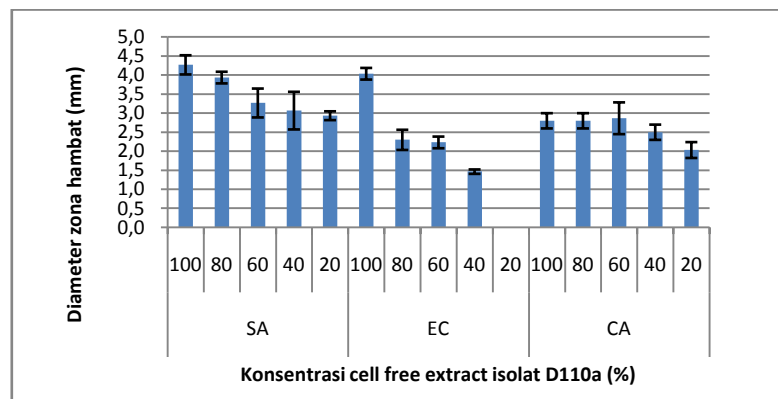
Gambar 29. Diameter zona hambat yang dihasilkan cell free extract isolat D83

Dari gambar tersebut tampak bahwa cell free extract isolat D83 memiliki minimum inhibitory concentration (MIC) terhadap *S aureus* dan *C albican* sebesar 20% dan terhadap *E coli* sebesar 100%



Gambar 30. Diameter zona hambatan yang dihasilkan protein isolat D110a

Dari gambar tersebut tampak bahwa protein isolat D110a memiliki minimum inhibitory concentration (MIC) terhadap *S. aureus* dan *C. albicans* sebesar 0,15 µg/µl dan terhadap *E. coli* 0,77 µg/µl.

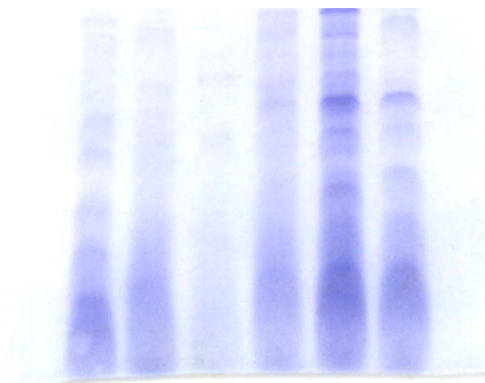


Gambar 31. Diameter zona hambatan yang dihasilkan cell free extract isolat D110a

Dari gambar tersebut tampak bahwa cell free extract isolat D110a memiliki minimum inhibitory concentration (MIC) terhadap *S. aureus* dan *C. albicans* sebesar 20% dan terhadap *E. coli* sebesar 40%

Protein yang sudah diendapkan dengan ammonium sulfat selanjutnya dibersihkan dengan dialisis. Hasilnya dirunning dengan SDS page.

D83 D94b D104c D110a D113 D153



Gambar 32. Hasil SDS PAGE protein dari 6 isolat

Besar konsentrasi protein diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Dan hasil yang diperoleh ditunjukkan pada Tabel 7.

Tabel 7. Konsentrasi protein ekstraseluler masing-masing isolat

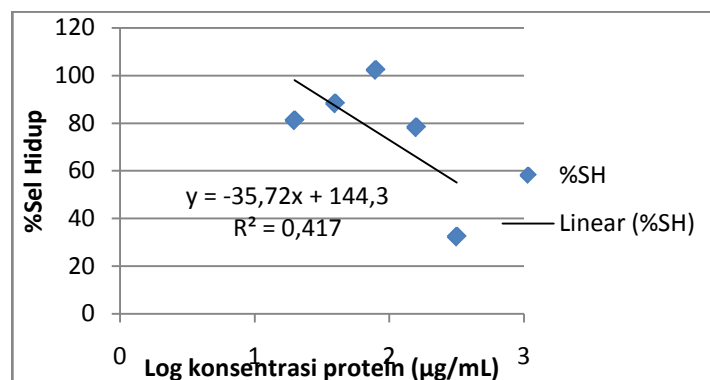
Isolat	Konsentrasi Protein	
	$\mu\text{g}/\mu\text{L}$	$\mu\text{g}/\text{mL}$
D94b	0,8532	853
D153	0,6758	675
D113	0,9446	944
D83	0,6327	632
D110a	0,7779	777
D104c	0,3263	326

Protein ini kemudian digunakan untuk uji sitotoksik pada sel kanker T47D dengan pengenceran berseri

Tabel 8. Hasil pembacaan nilai absorbansi sel hidup dari lima seri konsentrasi protein isolat D83

Konsentrasi protein ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Log konsentrasi protein	Rerata nilai absorbansi perlakuan	% Sel Hidup
316	2,499	0,265	32,48
158	2,198	0,517	78,32
79	1,897	0,649	102,36
39,5	1,596	0,572	88,34
19,75	1,295	0,533	81,23
Nilai absorbansi Kultur sel		0,636	
Nilai absorbansi Blanko		0,087	

Berdasarkan hasil tersebut dibuat grafik hubungan antara konsentrasi protein dengan % sel hidup sebagai berikut.



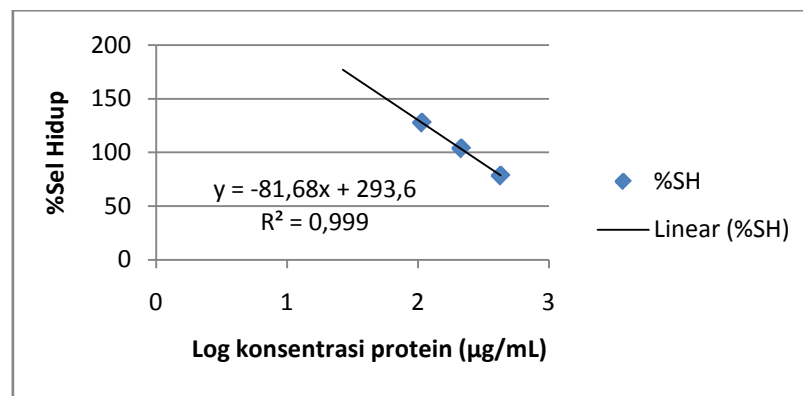
Gambar 33. Hubungan antara konsentrasi protein dengan % sel hidup

Menurut grafik tersebut diperoleh nilai  $IC_{50}$  yang menunjukkan konsentrasi protein dari isolat D83 yang dapat menyebabkan kematian 50% sel kanker, yaitu 436,5  $\mu\text{g/mL}$ .

Tabel 9. Hasil pembacaan nilai absorbansi sel hidup dari lima seri konsentrasi protein isolat D94b

Konsentrasi protein ( $\mu\text{g/mL}$ )	Log konsentrasi protein	Rerata nilai absorbansi perlakuan	% Sel Hidup
426,5	2,629919	0,518	78,56709
213,25	2,328889	0,657	103,8251
106,625	2,027859	0,788	127,7474
53,312	1,726825	0,773	125,0759
26,656	1,425795	0,682	108,4396
Nilai absorbansi Kultur sel		0,636	
Nilai absorbansi Blanko		0,087	

Berdasarkan hasil tersebut dibuat grafik hubungan antara konsentrasi protein dengan % sel hidup sebagai berikut.



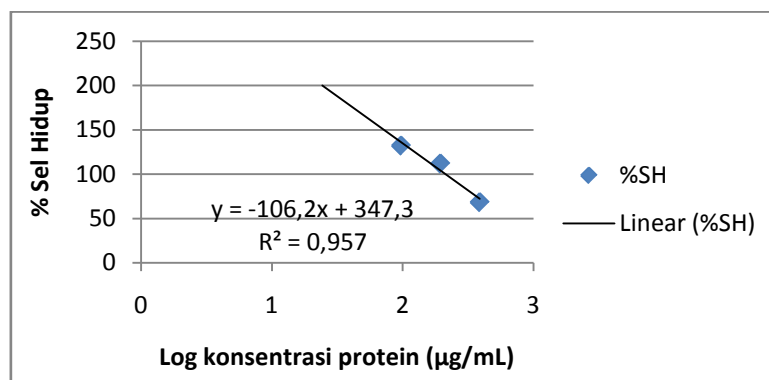
Gambar 34. Hubungan antara konsentrasi protein dengan % sel hidup

Menurut grafik tersebut diperoleh nilai  $IC_{50}$  yang menunjukkan konsentrasi protein dari isolat D94b yang dapat menyebabkan kematian 50% sel kanker, yaitu 954,99  $\mu\text{g/mL}$ .

Tabel 10. Hasil pembacaan nilai absorbansi sel hidup dari lima seri konsentrasi protein isolat D110a

Konsentrasi protein ( $\mu\text{g/mL}$ )	Log konsentrasi protein	Rerata nilai absorbansi perlakuan	% Sel Hidup
388,5	2,589	0,461	68,24
194,25	2,288	0,701	111,96
97,125	1,987	0,813	132,24
48,562	1,686	0,876	143,77
24,281	1,385267	0,798	129,62
Nilai absorbansi Kultur sel		0,636	
Nilai absorbansi Blanko		0,087	

Berdasarkan hasil tersebut dibuat grafik hubungan antara konsentrasi protein dengan % sel hidup sebagai berikut.



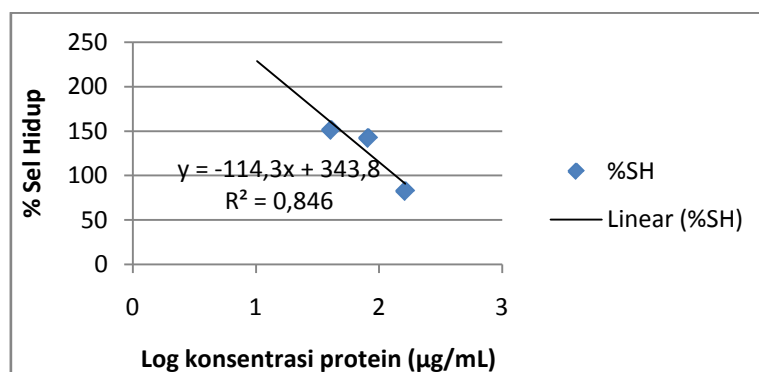
Gambar 35. Hubungan antara konsentrasi protein dengan % sel hidup

Menurut grafik tersebut diperoleh nilai  $IC_{50}$  yang menunjukkan konsentrasi protein dari isolat D110a yang dapat menyebabkan kematian 50% sel kanker, yaitu 629,5 µg/mL.

Tabel 11. Hasil pembacaan nilai absorbansi sel hidup dari lima seri konsentrasi protein isolat D104

Konsentrasi protein (µg/mL)	Log konsentrasi protein	Rerata nilai absorbansi perlakuan	% Sel Hidup
163	2,212	0,539	82,39
81,5	1,911	0,868	142,20
40,75	1,610	0,917	151,24
20,375	1,309	0,960	158,96
10,187	1,008046	0,861	141,04
Nilai absorbansi Kultur sel		0,636	
Nilai absorbansi Blanko		0,087	

Berdasarkan hasil tersebut dibuat grafik hubungan antara konsentrasi protein dengan % sel hidup sebagai berikut.



Gambar 36. Hubungan antara konsentrasi protein dengan % sel hidup

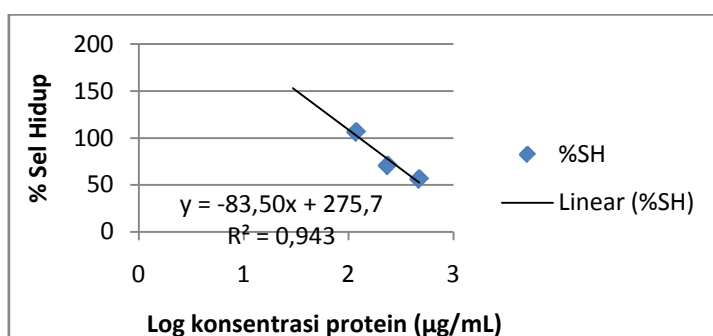


Menurut grafik tersebut diperoleh nilai  $IC_{50}$  yang menunjukkan konsentrasi protein dari isolat D104 yang dapat menyebabkan kematian 50% sel kanker, yaitu 371,5  $\mu\text{g/mL}$ .

Tabel 12. Hasil pembacaan nilai absorbansi sel hidup dari lima seri konsentrasi protein isolat D113

Konsentrasi protein ( $\mu\text{g/mL}$ )	Log konsentrasi protein	Rerata nilai absorbansi perlakuan	% Sel Hidup
472	2,674	0,394	55,98
236	2,373	0,474	70,49
118	2,072	0,670	106,25
59	1,771	0,660	104,31
29,5	1,469822	0,599	93,32
Nilai absorbansi Kultur sel		0,636	
Nilai absorbansi Blanko		0,087	

Berdasarkan hasil tersebut dibuat grafik hubungan antara konsentrasi protein dengan % sel hidup sebagai berikut.



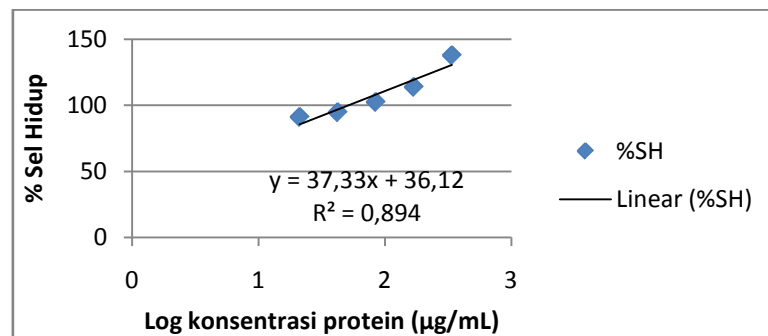
Gambar 37. Hubungan antara konsentrasi protein dengan % sel hidup

Menurut grafik tersebut diperoleh nilai  $IC_{50}$  yang menunjukkan konsentrasi protein dari isolat D113 yang dapat menyebabkan kematian 50% sel kanker, yaitu 501,1  $\mu\text{g/mL}$ .

Tabel 13. Hasil pembacaan nilai absorbansi sel hidup dari lima seri konsentrasi protein isolat D153

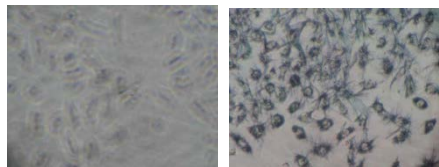
Konsentrasi protein ( $\mu\text{g/mL}$ )	Log konsentrasi protein	Rerata nilai absorbansi perlakuan	% Sel Hidup
337,5	2,528	0,844	137,83
168,75	2,227	0,712	113,90
84,375	1,926	0,650	102,49
42,187	1,625	0,607	94,78
21,093	1,324138	0,588	91,20
Nilai absorbansi Kultur sel		0,636	
Nilai absorbansi Blanko		0,087	

Berdasarkan hasil tersebut dibuat grafik hubungan antara konsentrasi protein dengan % sel hidup sebagai berikut.

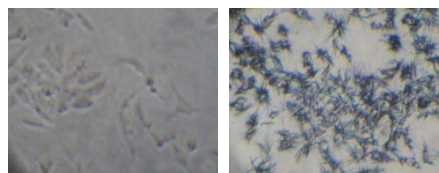


Gambar 38. Hubungan antara konsentrasi protein dengan % sel hidup

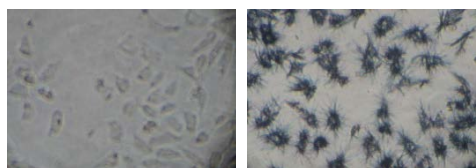
Menurut grafik tersebut diperoleh nilai  $IC_{50}$  yang menunjukkan konsentrasi protein dari isolat D153 yang dapat menyebabkan kematian 50% sel kanker, yaitu 2,35 µg/mL. Berikut ini adalah gambar sel setelah diberi perlakuan dan MTT.



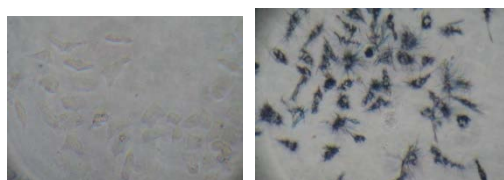
Gambar 39. Morfologi sel T47D setelah diberi protein (kiri) dan MTT (kanan) dari isolat D83



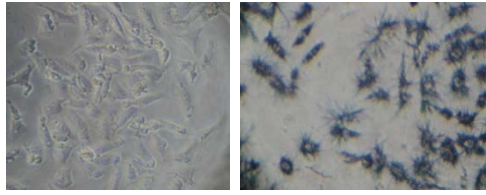
Gambar 40. Morfologi sel T47D setelah diberi protein (kiri) dan MTT (kanan) dari isolat D94b



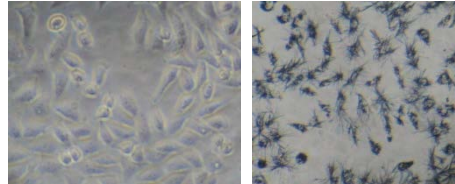
Gambar 41. Morfologi sel T47D setelah diberi protein (kiri) dan MTT (kanan) dari isolat D110a



Gambar 42. Morfologi sel T47D setelah diberi protein (kiri) dan MTT (kanan) dari isolat D104c



Gambar 43. Morfologi sel T47D setelah diberi protein (kiri) dan MTT (kanan) dari isolat D113



Gambar 44. Morfologi sel T47D setelah diberi protein (kiri) dan MTT (kanan) dari isolat D153

## B Pembahasan

Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa AMP, baik yang sintetik maupun alami bisa meningkatkan sistem imun dan berpotensi sebagai antibiotik yang potensial. Adanya ikatan elektrostatis antara komponen bakteri dan sel kanker yang bermuatan negatif dan AMP yang bermuatan positif dipercaya berperana penting untuk membuat ikatan yang kuat dan selektif di dalam merusak membran sel bakteri maupun sel kanker. Sebagian besar AMP dapat membunuh bakteri baik yang gram positif maupun gram negatif, dan sejumlah peptida bakterisidal ini juga memiliki aktivitas antikanker dan antiviral. Peptida yang ditemukan memiliki kemampuan dalam menetralkan lipopolisakarida (LPS) dan kemampuan untuk meningkatkan respon imun adaptif (Hoskin, D. W. and Ramamoorthy, A., 2008).

Berdasarkan hasil penelitian yang sudah dilakukan, tidak semua AMP memiliki aktivitas antimikrobia dan antikanker, sehingga terdapat dua kelompok AMP, yaitu (a) AMP yang sangat poten dalam membunuh sel bakteri dan sel kanker tetapi tidak dapat membunuh sel normal mamalia, dan (b) AMP yang bersifat sitotoksik pada bakteri, sel kanker maupun sel mamalia normal. Sekuen asam amino pada AMP yang berbeda sangat heterogen dan memiliki variasi yang sangat besar pada struktur sekundernya. AMP secara umum bersifat kationik (memiliki muatan pada pH netral antara +2 sampai +9) dan bersifat amfipatik, yang memungkinkan peptida ini berinteraksi dengan membran dan merusak lipid membran. Sebagian besar AMP memiliki struktur yang pendek, hanya terdiri dari 5 sampai 40 residu asam amino, dan sedikit jumlahnya yang memiliki panjang sampai lebih dari 40 residu.

Residu yang mempunyai muatan positif seperti Lys dan Arg dan sebagian mempunyai residu yang bersifat hidrofobik (~30% atau lebih) biasanya ditemukan pada peptida ini. Sifat penting yang dimiliki oleh AMP, seperti tritrypticin, lactoferricins dan indolicidin, mereka kaya akan residu Trp dan Arg residues. Studi telah menunjukkan bahwa semua analog D-amino-acid memiliki aktivitas yang identik, tetapi memiliki khiralitas yang berkebalikan dengan semua L-peptida; sifat ini digunakan untuk mendesain AMP yang tahan terhadap degradasi proteolitik. Tidak seperti antibiotik yang konvensional yang biasanya berinteraksi hanya dengan target khusus, sebagian besar kationik AMP memiliki target membran sel dari mikroorganisme yang menyerang, dan menyebabkan sel lisis dan mati (Hoskin, D. W. and Ramamoorthy, A., 2008).

Perbedaan sifat biokimiawi dan biofisik dari mikrobial dengan sel inangnya dan adanya setting sel mana yang menjadi target dari peptida memberikan dasar toksisitas yang selektif dari AMP. Beberapa AMP memberikan mekanisme yang dinamis dalam bekerja pada fosfolipid bilayer, sehingga memberikan pengaruh yang cepat dan poten (Yeaman, M. R. and Yount, N. Y., 2003).

## BAB VI RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

Rencana tahun kedua adalah memurnikan protein yang sudah dihasilkan dan mengujinya lagi terhadap sel kanker T47D. Selain itu akan dilihat mekanisme kerja antikanker dari protein yang sudah diisolasi pada tahun pertama. Tujuan khusus dari penelitian pada tahun kedua adalah:

1. Mengetahui pengaruh protein terhadap daur sel T47D.
2. Mengetahui pengaruh protein pada proliferasi sel T47D.
3. Mengetahui kemampuan protein dalam menginduksi apoptosis sel T47D
4. Mengetahui pengaruh protein pada penggandaan sel (*doubling time*) T47D

### Uji kinetika proliferasi sel

Sel ( $2 \times 10^4$ ) didistribusikan pada *96 well plate* kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO<sub>2</sub>, selanjutnya ditambahkan ekstrak dengan berbagai seri kadar ke dalam sumuran dan inkubasi dilanjutkan selama 0, 6, 12, 24, 48 dan 72 jam. Pada akhir inkubasi, pada kultur tersebut ditambah 15  $\mu$ l reagen MTT dan diinkubasi kembali selama 6 jam. Reaksi MTT dihentikan dengan reagen stopper, lalu diinkubasi semalam pada suhu kamar. Serapan dibaca dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang 550 nm. Hasil absorbansi yang terbaca dikonversikan dalam persentase kehidupan.

### Uji Apoptosis dan Pengecatan DNA

#### a. Pembuatan larutan pewarna (EB/AO)

Larutan stok dibuat dengan melarutkan 50 mg etidium bromida dan 15 mg akridin oranye dilarutkan dalam 1 ml etanol 95%, kemudian ditambah akuades hingga 50 ml. Larutan yang digunakan untuk pewarnaan adalah pengenceran 100 kali dengan PBS dari larutan stok.

#### b. Pengecatan DNA menggunakan pewarna ganda

*Coverslip* diletakkan dalam kultur *plate* 24 sumuran. Tiap sumuran diisi 50.000 suspensi sel dalam 200 ml media kultur tepat diatas *coverslip*, didiamkan beberapa saat kemudian ditambahkan 300 ml media kultur, dan diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO<sub>2</sub>. Setelah 24 jam diberi perlakuan dengan SBM 500 mg/ml dan FA 150 mg/ml dan diinkubasi kembali dalam inkubator CO<sub>2</sub> selama 24 jam. Setelah 24 jam seluruh media pada sumuran dibuang, *coverslip* diambil menggunakan pinset dan dipindahkan pada kaca obyek, kemudian ditambahkan 10 ml larutan EB/AO didiamkan sejenak kemudian diamati dibawah mikroskop fluoresensi.

### **Uji *doubling time* sel**

Sel ( $1,5 \times 10^4$ ) dipuasakan (starvasi) dengan media kultur yang mengandung 0,5 % FBS selama 24 jam (Meiyanto *et al.*, 2001), kemudian ditumbuhkan di dalam sumuran yang mengandung sample uji dengan kadar 25, 50 dan 100  $\mu\text{g/ml}$ . Populasi sel pada setiap seri percobaan dihitung pada jam ke-6, 12, 24, 48 dan 72, dengan *hemocytometer* setelah ditambah *tripan blue*, kemudian dibuat kurva jumlah sel *vs* waktu inkubasi. *Doubling time* dihitung dari slop setelah dibuat garis lurus pada kurva (Doyle, 2000).

### **Analisis daur sel menggunakan *flowcytometer* :**

Sel T47D yang telah dipanen didistribusikan pada kultur plate 6 sumuran sejumlah  $5 \times 10^5$  sel/sumuran. Setelah inkubasi selama 24 jam sel diberi perlakuan dengan SBM 400  $\mu\text{g/ml}$ , 500  $\mu\text{g/ml}$ , 600  $\mu\text{g/ml}$ , dan FA 100  $\mu\text{g/ml}$ , 200  $\mu\text{g/ml}$ , 300  $\mu\text{g/ml}$ . Pemanenan sel dilakukan pada jam ke 24 dan jam 48 setelah perlakuan. Sel dipanen menggunakan tripsin/EDTA 0.25%/0.02%, kemudian disentrifugasi 1000 RPM selama 5 menit, dan dicuci dengan PBS dingin. Sel diinkubasi dengan larutan propidium iodida 500  $\mu\text{l}$  (propidium iodida 50  $\mu\text{g/ml}$  dalam PBS yang mengandung 0.1% triton-X). Sel selanjutnya diberi perlakuan dengan RNase bebas DNase (20  $\mu\text{g/ml}$ ) selama 10 menit pada suhu  $37^\circ\text{C}$ . Sel dianalisis dengan alat *flowcytometer* BD FACSCalibur.

## **BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN**

### **A. Kesimpulan**

- a. Terdapat 6 isolat bakteri yang menghasilkan *Cationic Antimicrobial Peptides* (AMPs)
- b. Enam isolat memiliki karakter morfologis, kimiawi yang berbeda
- c. Masing-masing isolat memiliki efek sitotoksik ekstrak terhadap sel kanker T47D yang berbeda dilihat dari nilai IC 50. Isolat D83 436,5 µg/mL, D94b 954,99 µg/mL, D110a 629,5 µg/mL, D104c 371,5 µg/mL, D113 501,1 µg/mL, dan D153 2,35 µg/mL
- d. Masing-masing isolat menghasilkan protein yang memiliki potensi antibakteri terhadap bakteri pathogen, kecuali protein yang dihasilkan oleh isolat D83 dan D104c yang tidak memiliki kemampuan antibakteri terhadap *E coli*
- e. Masing-masing isolat memiliki potensi antifungi terhadap fungi pathogen

### **B. Saran**

Dilakukan uji lebih lanjut mengenai struktur protein dan mekanisme kerja dari anti mikrobial dan antikanker

## DAFTAR PUSTAKA

- Boyer, M.J., and Tannock, I.F., 2005, *The Basic Science of Oncology: Cellular and Molecular Basis of Drug Treatment for Cancer*, Mc Graw Hill Compay, forth edition, New York.
- Brem, S., MD, 1999, *Angiogenesis and Cancer Control: From Concept to Therapeutic Trial*, *Moffitt Cancer Center & Research institute*, (<http://www.medscape.com/cancercontrol/1999/v06.n02.brem/cc0605.02.brem-01.html>)
- Chevile NF. 1999. *Introduction to Veterinary Pathology*. 2nd. Ed. Iovastate University Press/AMS.
- Crowel, J.A. 2005. The chemopreventive agent development research program in the Division of Cancer Prevention of the US National Cancer Institute: An overview. *European Journal of Cancer*, v.41, p.1889–1910,.
- Dorai ,T., Aggarwal, B.B. 2004 Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Lett.* Nov 25;215(2):129-40
- Folkman, J., 1976, The Vascularization of Tumors, *Sci Am*, **6**:59-73
- Flora SD, Ferguson LR. 2005. Overviuw of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutation reseach* 591: 8-15.
- Gerhäuser C. *et al.* 2005. Mechanism-based in vitro screening of potential cancer chemopreventive agents. [www.elsevier.com/locate/molmut](http://www.elsevier.com/locate/molmut).
- Gondhowiardjo, S., 2004, Proliferasi Sel dan Keganasan, *Majalah Kedokteran Indonesia*, **54** (7): 289-299
- Hoskin, D. W. and Ramamoorthy, A. 2008. Studies on Anticancer Activities of Antimicrobial Peptides. *Biochim Biophys Acta*. 2008 February ; 1778(2): 357–375.
- Jadav SJ, Nimbakar SS, Kalkuni AD, dan Madhavi. 1996. *Lipid oxidation in biological and food systems*. Food Antioxidant. Marchel Dekker Inc.
- Kakizoe, T., 2003, Chemoprevention of Cancer Focusing on Cinical Trial, Nationa Cancer Center, *Jpn.J.Clin.Oncol.*, **33**(9): 421-442
- King, R. J. B., 2000, *Cancer Biology*, 2nd ed, Pearson Eduation Limited, London.
- Macdonald,F.,Ford,C.H.J.,1997, *Molecular Biology of Cancer*, BIOS Scientific Publishers Ltd.
- Matter, A., 2001, Tumor Angiogenesis as a Theurapeutic Target, *DDT*, Vol.6, No.19, Hal. 1005-1020.
- Montgomery, R.,Dryer, L. R., Conway, W. T., Spector,A.A.,1993. Biokimia suatu pendekatan Berorientasi Kasus, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta, 1071 – 1106



- Mulyani, Sri.,1992, Pedoman Kuliah Karsinogenik dan Antineoplastik, PAU-Boteknologi UGM, Yogyakarta
- Parton, Martina., Dowsett, Mitchel., and Smith, I., 2001, Studies of Apoptosis in Breast Cancer, *BMJ*, 322: 1528-1532
- Pan, M.H., Chen, W.J., Lin, S., Ho, C.H., Lin, J.K., 2002, Tangeretin Induces Cell Cycle Through Inhibiting Cyclin Dependent Kinase 2 & 4 Activities As Well As Elevating Cdk Inhibitor p21 in Human Colorectal Carcinoma Cells, *Carsinogenesis*, Oxford University Press, **23**: 1677-1684
- Poeloengan dan Soeripto. 1998. Pengaruh Putih Telur Terhadap Pertumbuhan Gram Positif Dan Gram Negatif Secara In Vitro. Media kedokteran Hewan Institute Pertanian Bogor. Bogor.
- Steele VE, Kellof GJ. 2005. Development of cancer chemopreventive drugs based on mechanistic approaches. *Muta Res* (591): 16-23
- Surh, Y. J., 1999, Molecular Mechanism of Chemopreventive Effect of Selected Dietary and Medicinal Phenolic Substances, *Mutation Res.* **428**: 305-327.
- Yeaman, M. R. and Yount, N. Y 2003 . Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacol Rev* 55:27–55, Vol. 55, No. 1

## LAMPIRAN

### TIM PENELITIAN

NO.	Nama NIP	Jabatan Dalam Tim Alokasi Waktu, Jam/Minggu	Tugas Penelitian
1.	Evy Yulianti, M.Sc	Ketua	Mengkoordinasi pelaksanaan, studi literatur, membuat proposal, melaksanakan penelitian, membuat laporan
	19800726 200501 2 001	12 jam/minggu	
2.	Anna Rakhmawati, M.Si	Anggota	Studi literatur, melaksanakan penelitian, membuat laporan
		8 jam/minggu	
3	dr Kartika Ratna pertiwi, M Biomed Sc	Anggota	Studi literatur, melaksanakan penelitian, membuat laporan
		8 jam/minggu	

### Publikasi

Dipublikasi dalam Seminar Nasional Jurdik Biologi FMIPA UNY dengan Tema Current Biological Research and education in Life Supporting System Conservation dengan no ISBN 978-602-95166-2-3 Tanggal 19 November 2013

### Isolat Hasil Reisolasi

No	Kode Isolat	Tumbuh 24 jam	Tumbuh 48 jam	Tumbuh 72 jam	Tumbuh 96 jam	Lebih dari 96 jam	Tumbuh 55°C	Tumbuh 70°C	Tumbuh 37°C
1.	D1	√					√		√
2.	D2	√					√	√	
3.	D3	√					√		√
4.	D4			√			√		√
5.	D5			√			√		√
6.	D6a		√				√		√
7.	D6b		√				√		√
8.	D7a	√					√		√
9.	D7b	√					√		√
10.	D8	√					√		√
11.	D9			√			√		√
12.	D10	√					√		√
13.	D11			√			√		√
14.	D12	√					√		√
15.	D13a			√			√		√
16.	D13b			√			√		√
17.	D14	√					√		√
18.	D15		√				√		√
19.	D16	√					√		√
20.	D17			√			√		√
21.	D19		√				√		√
22.	D27	√					√		√
23.	D32		√				√		√
24.	D37	√					√		√
25.	D41	√					√		√

26.	D43a		√				√	√	√
27.	D43b		√				√		√
28.	D48a					√	√		√
29.	D48b					√	√		√
30.	D50a	√					√		√
31.	D50b	√					√		√
32.	D50c	√					√		√
33.	D55a	√					√		√
34.	D55b				√		√		√
35.	D55c				√		√		√
36.	D74	√					√		√
37.	D75	√					√		√
38.	D76a				√		√		√
39.	D76b				√		√		√
40.	D76c				√		√		√
41.	D79				√		√		√
42.	D82					√	√		√
43.	D83	√					√	√	√
44.	D84a			√			√		√
45.	D84b			√			√		√
46.	D86		√				√		√
47.	D87			√			√		√
48.	D89			√			√		√
49.	D90	√					√		√
50.	D91	√					√		√
51.	D92	√					√	√	
52.	D93	√					√		√
53.	D94a					√	√		√
54.	D94b					√	√	√	√
55.	D95		√				√		√
56.	D96			√			√		√
57.	D97		√				√		√
58.	D99		√				√		√
59.	D100	√					√		√
60.	D101	√					√		√
61.	D102	√					√		√
62.	D103		√				√		√
63.	D104a		√				√		√
64.	D104b	√					√		√
65.	D104c		√				√	√	√
66.	D109	√					√		√
67.	D110a					√	√	√	√
68.	D110b					√	√		√
69.	D110c					√	√		√
70.	D111	√					√		√
71.	D112	√					√	√	√
72.	D113	√					√	√	√
73.	D114			√			√		√
74.	D115a				√		√		√
75.	D115b				√		√		√
76.	D117a		√				√		√
77.	D118a			√			√		√
78.	D118b			√			√		√
79.	D119a			√			√		√
80.	D119b			√			√		√
81.	D123a		√				√		
82.	D123b		√				√		√
83.	D131a		√				√		√

84	D131b		√				√		√
85	D131c			√			√		√
86	D131d			√			√		√
87	D132a					√	√		√
88	D132b					√	√	√	√
89	D134	√					√		√
90	D135		√				√		√
91	D138	√					√		√
92	D140a		√				√		√
93	D140b		√				√		√
94	D141		√				√		√
95	D146					√	√		√
96	D147	√					√		√
97	D150a	√					√		√
98	D150b			√			√		√
99	D151a	√					√		√
100	D151b	√					√		√
101	D153		√				√	√	√
102	D154					√	√		√
Jumlah		38	24	20	8	12	102	11	99

### Hasil Uji Antibakteri Koloni

isolat	Patogen	dzj1	dzj2	dzj3	dk1	dk2	dk3	reratadzj	reratadk	nisbahzj
D153	e1	0	0	0	0	0	0			
1		0	0	0	0	0	0			
	e2	0	0	0	0	0	0			
		0	0	0	0	0	0			
	s1	1,25	1,2	1,17	0,5	0,5	0,5	1,17	0,5	2,34
		1,1	0,92	1,2	0,5	0,5	0,5			
	s2	1,2	1,12	1,22	0,5	0,5	0,5			
		1,25	1,15	1,26	0,5	0,5	0,5			
D113	e1	0	0	0	0	0	0			
2		0	0	0	0	0	0			
	e2	0	0	0	0	0	0			
		0	0	0	0	0	0			
	s1	1,1	1,2	1,2	0,5	0,5	0,5	1,080833	0,67	1,613184
		0,8	0,89	0,92	0,5	0,5	0,5			
	s2	0,84	0,85	0,85	0,5	0,5	0,5			
		1,42	1,5	1,4	1,14	1,2	1,2			
D110	e1	0,76	0,75	0,73	0,5	0,5	0,5	0,883333	0,673333	1,311881
3		1,1	1	1,2	0,86	0,8	0,82			
	e2	1	1	1,1	0,9	0,8	0,9			
		0,62	0,66	0,68	0,5	0,5	0,5			
	s1	0,84	0,82	0,86	0,5	0,5	0,5	0,945	0,5	1,89
		0,86	0,89	0,91	0,5	0,5	0,5			
	s2	0,98	0,87	0,8	0,5	0,5	0,5			
		1,2	1,14	1,17	0,5	0,5	0,5			

D104c	e1	0,9	0,89	0,92	0,5	0,5	0,5	0,909167	0,5	1,818333
4		0,88	0,9	0,9	0,5	0,5	0,5			
	e2	1,1	1	1,2	0,5	0,5	0,5			
		0,75	0,76	0,71	0,5	0,5	0,5			
	s1	0	0	0	0	0	0			
		0	0	0	0	0	0			
	s2	0	0	0	0	0	0			
		0	0	0	0	0	0			
D94b	e1	0	0	0	0	0	0	0,733333	0,5	1,466667
5		0	0	0	0	0	0			
	e2	0,71	0,77	0,8	0,5	0,5	0,5			
		0,7	0,72	0,7	0,5	0,5	0,5			
	s1	0,75	0,7	0,8	0,5	0,5	0,5	0,795	0,5	1,59
		0,8	0,83	1,1	0,5	0,5	0,5			
	s2	0,75	0,86	0,77	0,5	0,5	0,5			
		0,71	0,74	0,73	0,5	0,5	0,5			
D132b	e1	0,82	0,6	0,72	0,5	0,5	0,5	0,773333	0,5	1,546667
6		0,89	0,9	0,84	0,5	0,5	0,5			
	e2	0,8	0,77	0,7	0,5	0,5	0,5			
		0,72	0,75	0,77	0,5	0,5	0,5			
	s1	0,63	0,68	0,64	0,5	0,5	0,5	0,685833	0,5	1,371667
		0,6	0,64	0,61	0,5	0,5	0,5			
	s2	0,7	0,68	0,7	0,5	0,5	0,5			
		0,8	0,78	0,77	0,5	0,5	0,5			
D83	e1	0,91	0,77	0,8	0,5	0,5	0,5	0,745833	0,5	1,491667
7		0,68	0,69	0,81	0,5	0,5	0,5			
	e2	0,8	0,82	0,8	0,5	0,5	0,5			
		0,62	0,6	0,65	0,5	0,5	0,5			
	s1	0	0	0	0	0	0			
		0	0	0	0	0	0			
	s2	0	0	0	0	0	0			
		0	0	0	0	0	0			

### Hasil Uji Antijamur Koloni

isolat	patogen	dzj1	dzj2	dzj3	dk1	dk2	dk3	reratadzj	reratadk	nisbahzj
D153	c 1	0,71	0,75	0,68	0,5	0,5	0,5	0,724167	0,5375	1,347287
1		0,8	0,73	0,74	0,65	0,65	0,65			
	c2	0,73	0,74	0,77	0,5	0,5	0,5			
		0,67	0,69	0,68	0,5	0,5	0,5			
	t1	0	0	0	0,5	0,5	0,5			
		0	0	0	0,5	0,5	0,5			
	t2	0	0	0	0,5	0,5	0,5			
		0	0	0	0,5	0,5	0,5			
D113	c 1	0,66	0,65	0,6	0,5	0,5	0,5	0,658333	0,5	1,316667

2		0,64	0,66	0,74	0,5	0,5	0,5			
	c2	0	0	0	0,5	0,5	0,5			
		0	0	0	0,5	0,5	0,5			
	t1	0	0	0	0,5	0,5	0,5			
		0	0	0	0,5	0,5	0,5			
	t2	0	0	0	0,5	0,5	0,5			
		0	0	0	0,5	0,5	0,5			
D110	c 1	0,7	0,71	0,72	0,5	0,5	0,5	0,699167	0,5	1,398333
3		0,67	0,65	0,66	0,5	0,5	0,5			
	c2	0,64	0,67	0,64	0,5	0,5	0,5			
		0,74	0,8	0,79	0,5	0,5	0,5			
	t1	0	0	0	0,5	0,5	0,5			
		0	0	0	0,5	0,5	0,5			
	t2	0	0	0	0,5	0,5	0,5			
		0	0	0	0,5	0,5	0,5			
D104c	c 1	0	0	0	0,5	0,5	0,5			
4		0	0	0	0,5	0,5	0,5			
	c2	0	0	0	0,5	0,5	0,5			
		0	0	0	0,5	0,5	0,5			
	t1	0	0	0	0,5	0,5	0,5			
		0	0	0	0,5	0,5	0,5			
	t2	0	0	0	0,5	0,5	0,5			
		0	0	0	0,5	0,5	0,5			
D94b	c 1	0,75	0,76	0,71	0,5	0,5	0,5	0,735	0,5	1,47
5		0,69	0,7	0,71	0,5	0,5	0,5			
	c2	0,76	0,75	0,72	0,5	0,5	0,5			
		0,74	0,8	0,73	0,5	0,5	0,5			
	t1	0	0	0	0,5	0,5	0,5			
		0	0	0	0,5	0,5	0,5			
	t2	0	0	0	0,5	0,5	0,5			
		0	0	0	0,5	0,5	0,5			
D132b	c 1	0,73	0,61	0,66	0,5	0,5	0,5	0,683333	0,5	1,366667
6		0,65	0,69	0,76	0,5	0,5	0,5			
	c2	0	0	0	0,5	0,5	0,5			
		0	0	0	0,5	0,5	0,5			
	t1	0	0	0	0,5	0,5	0,5			
		0	0	0	0,5	0,5	0,5			
	t2	0	0	0	0,5	0,5	0,5			
		0	0	0	0,5	0,5	0,5			
D83	c 1	0,67	0,66	0,68	0,5	0,5	0,5	0,658333	0,5	1,316667
7		0,63	0,65	0,66	0,5	0,5	0,5			
	c2	0	0	0	0,5	0,5	0,5			
		0	0	0	0,5	0,5	0,5			
	t1	0	0	0	0,5	0,5	0,5			
		0	0	0	0,5	0,5	0,5			

	t2	0	0	0	0,5	0,5	0,5			
		0	0	0	0,5	0,5	0,5			

### Hasil Uji Antimikrobia Protein dan CFE

isolat	patogen	Konsent ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	protein			rata2	sd	diameter zona hambat	Konset (%)	cfe			rata2	sd	diameter zona hambat
113a	SA	0,94	7,2	7	7,3	7,2	0,2	2,2	100	7,8	7,4	7,2	7,5	0,3	2,5
		0,75	7,5	7	6,7	7,1	0,4	2,1	80	7,4	7	7,2	7,2	0,2	2,2
		0,56	7,4	7	6,6	7,0	0,4	2,0	60	7,8	7,2	7	7,3	0,4	2,3
		0,38	6,7	6,6	6,5	6,6	0,1	1,6	40	7,4	7	6,7	7,0	0,4	2,0
		0,19	6,7	6,5	6,4	6,5	0,2	1,5	20	7,4	7	6,9	7,1	0,3	2,1
	EC	0,94	6,2	6,3	6,2	6,2	0,1	1,2	100	6,1	6,2	6,1	6,1	0,1	1,1
		0,75	6,8	6,4	6,4	6,5	0,2	1,5	80	6,1	6,2	6,1	6,1	0,1	1,1
		0,56	6,6	6,2	6,2	6,3	0,2	1,3	60	6,4	6,3	6,3	6,3	0,1	1,3
		0,38	6,2	6,1	6,2	6,2	0,1	1,2	40	6,3	6,4	6,3	6,3	0,1	1,3
		0,19							20						
	CA	0,94	9	8,2	7,9	8,4	0,6	3,4	100	9	8,5	7,4	8,3	0,8	3,3
		0,75	8	8,4	8,6	8,3	0,3	3,3	80	8	7,6	7,8	7,8	0,2	2,8
		0,56	8	7,8	8,7	8,2	0,5	3,2	60	7,4	7,3	7,6	7,4	0,2	2,4
		0,38	7,9	7,8	7,8	7,8	0,1	2,8	40	7,8	7,4	7	7,4	0,4	2,4
		0,19	7,2	7,1	7	7,1	0,1	2,1	20	7	6,6	6,6	6,7	0,2	1,7
94b	SA	0,85	7,3	7	7,2	7,2	0,2	2,2	100	7	6,8	7,2	7,0	0,2	2,0
		0,68	7	6,9	6,8	6,9	0,1	1,9	80	6,6	6,7	6,4	6,6	0,2	1,6
		0,51	7	7,1	6,8	7,0	0,2	2,0	60	6,5	6,6	6,2	6,4	0,2	1,4
		0,34	7	6,7	6,5	6,7	0,3	1,7	40	6,6	6,5	6	6,4	0,3	1,4
		0,17	6,6	6,4	6,4	6,5	0,1	1,5	20	6,2	6,1	6,2	6,2	0,1	1,2
	EC	0,85	7,8	8	8,1	8,0	0,2	3,0	100	7,3	7,7	7,6	7,5	0,2	2,5
		0,68							80	9,2	9,6	9,3	9,4	0,2	4,4
		0,51							60						
		0,34							40						
		0,17							20						
	CA	0,85	8,4	8,5	9,5	8,8	0,6	3,8	100	9,8	9,5	9,6	9,6	0,2	4,6
		0,68	8,7	8,6	8,8	8,7	0,1	3,7	80	8,6	8,5	8,3	8,5	0,2	3,5
		0,51	7,8	7,7	7,6	7,7	0,1	2,7	60	8,4	8,7	7,9	8,3	0,4	3,3
		0,34	7,1	6,9	7	7,0	0,1	2,0	40	6,5	8,2	8,4	7,7	1,0	2,7
		0,17	6,8	7,3	7	7,0	0,3	2,0	20	7,8	7,2	7,4	7,5	0,3	2,5
153	SA	0,67	7,4	6,9	7,2	7,2	0,3	2,2	100	7,2	6,8	6,6	6,9	0,3	1,9
		0,54	7	6,3	6,4	6,6	0,4	1,6	80	6,6	6,5	6,4	6,5	0,1	1,5
		0,4	7,2	8,1	6,9	7,4	0,6	2,4	60	6,6	6,5	6,1	6,4	0,3	1,4
		0,27	7,1	7	7,2	7,1	0,1	2,1	40	6,1	6,2	6,4	6,2	0,2	1,2
		0,13	6,5	6,6	6,6	6,6	0,1	1,6	20	6	6	6	6,0	0,0	1,0
	EC	0,67	7	6,8	6,9	6,9	0,1	1,9	100	7,7	7,6	7,9	7,7	0,2	2,7
		0,54	7,4	7,3	7,5	7,4	0,1	2,4	80	8,8	8,7	9,3	8,9	0,3	3,9
		0,4	7,8	8	7,9	7,9	0,1	2,9	60	8,5	8,2	8,4	8,4	0,2	3,4

		0,27	10	9,4	9,7	9,7	0,3	4,7	40	7,5	7,6	7,8	7,6	0,2	2,6
		0,13	8,2	7,6	8,1	8,0	0,3	3,0	20	7,3	7,1	7	7,1	0,2	2,1
	CA	0,67	10	9,8	9,9	9,9	0,1	4,9	100	9,2	9,3	9,6	9,4	0,2	4,4
		0,54	9,2	9,7	8,8	9,2	0,5	4,2	80	9,3	9,4	9,1	9,3	0,2	4,3
		0,4	8,7	8,5	8,2	8,5	0,3	3,5	60	9,2	9,3	9,4	9,3	0,1	4,3
		0,27	8	8,2	8,4	8,2	0,2	3,2	40	10	10,1	10,2	10,1	0,1	5,1
		0,13	8,5	7,4	8,1	8,0	0,6	3,0	20	9,1	8,8	9,6	9,2	0,4	4,2
104c	SA	0,33	7,4	7,3	7,2	7,3	0,1	2,3	100	10,1	10	9,7	9,9	0,2	4,9
		0,26	7,2	7,4	7,3	7,3	0,1	2,3	80	8	7,8	7,5	7,8	0,3	2,8
		0,19	7,3	7,5	7,4	7,4	0,1	2,4	60	7	7,5	7,2	7,2	0,3	2,2
		0,13	7,6	7	7,1	7,2	0,3	2,2	40	7,1	7,2	7,2	7,2	0,1	2,2
		0,07	7,2	6,9	6,8	7,0	0,2	2,0	20	6,6	7,3	7,6	7,2	0,5	2,2
	EC	0,33							100	7,5	7,1	7,3	7,3	0,2	2,3
		0,26							80	7,3	7,4	7,6	7,4	0,2	2,4
		0,19							60	7,4	7	7,3	7,2	0,2	2,2
		0,13							40	7,3	7,2	7,1	7,2	0,1	2,2
		0,07							20						
	CA	0,33	8,3	8	8,3	8,2	0,2	3,2	100	9,6	9,5	9,6	9,6	0,1	4,6
		0,26	8,5	7,8	8,1	8,1	0,4	3,1	80	8,6	8,4	8,6	8,5	0,1	3,5
		0,19	7,8	7,3	7,7	7,6	0,3	2,6	60	7,4	7,6	7,1	7,4	0,3	2,4
		0,13	7	7,2	7,1	7,1	0,1	2,1	40	7,3	7	7,3	7,2	0,2	2,2
		0,07	6,4	6,5	6,3	6,4	0,1	1,4	20	7,7	7,6	6,2	7,2	0,8	2,2
83	SA	0,63	6,4	6,3	6,1	6,3	0,2	1,3	100	7,7	7,2	7,1	7,3	0,3	2,3
		0,5	7,4	7,5	7,6	7,5	0,1	2,5	80	7	6,6	6,5	6,7	0,3	1,7
		0,38	7	6,6	6,5	6,7	0,3	1,7	60	6,2	6,4	6,5	6,4	0,2	1,4
		0,25	6,6	6,5	6,6	6,6	0,1	1,6	40	6,1	6,2	6,1	6,1	0,1	1,1
		0,13	6,3	6,6	6,3	6,4	0,2	1,4	20	6,1	6,1	6,2	6,1	0,1	1,1
	EC	0,63							100	7	6,6	6,6	6,7	0,2	1,7
		0,5							80						
		0,38							60						
		0,25							40						
		0,13							20						
	CA	0,63	9	8,4	8,8	8,7	0,3	3,7	100	10,3	9,5	8	9,3	1,2	4,3
		0,5	7,7	7,4	7,2	7,4	0,3	2,4	80	9,6	9,5	9,6	9,6	0,1	4,6
		0,38	8	6,6	7	7,2	0,7	2,2	60	9,2	9,2	9	9,1	0,1	4,1
		0,25	6,8	6,9	7	6,9	0,1	1,9	40	8	7,6	7	7,5	0,5	2,5
		0,13	6,6	6,7	6,8	6,7	0,1	1,7	20	7	6,7	6,6	6,8	0,2	1,8
110a	SA	0,77	9,4	9	8,4	8,9	0,5	3,9	100	9,3	9,5	9	9,3	0,3	4,3
		0,62	9,3	9	8,4	8,9	0,5	3,9	80	9,1	8,8	8,9	8,9	0,2	3,9
		0,46	9,1	9	8,2	8,8	0,5	3,8	60	8	8,1	8,7	8,3	0,4	3,3
		0,3	8,7	8,6	8,6	8,6	0,1	3,6	40	8,3	8,4	7,5	8,1	0,5	3,1
		0,15	8,7	8	8,3	8,3	0,4	3,3	20	8	7,8	8	7,9	0,1	2,9
	EC	0,77	8,4	7,7	8,5	8,2	0,4	3,2	100	9,2	8,9	9	9,0	0,2	4,0
		0,62							80	7,4	7,5	7	7,3	0,3	2,3
		0,46							60	7,4	7,2	7,1	7,2	0,2	2,2



		0,3							40	6,5	6,4	6,5	6,5	0,1	1,5
		0,15							20						
	CA	0,77	8,3	7,5	7,6	7,8	0,4	2,8	100	8	7,8	7,6	7,8	0,2	2,8
		0,62	8,4	8,1	7,8	8,1	0,3	3,1	80	8	7,6	7,8	7,8	0,2	2,8
		0,46	7,6	7,7	7,6	7,6	0,1	2,6	60	7,4	8,2	8	7,9	0,4	2,9
		0,3	7,8	7,4	7,9	7,7	0,3	2,7	40	7,7	7,5	7,3	7,5	0,2	2,5
		0,15	7,3	7,4	7,6	7,4	0,2	2,4	20	7,2	7,1	6,8	7,0	0,2	2,0

## Hasil Pembacaan Elisa Reader

	1	2	3
	0.273	0.259	0.264
	0.489	0.537	0.523
	0.616	0.678	0.661
D	0.575	0.579	0.562
E	0.514	0.558	0.533
F	0.408	0.510	0.712
G	0.418	0.477	0.723
H	0.365	0.435	0.576
	4	5	6
A	0.489	0.512	0.554
B	0.638	0.676	0.665
C	0.755	0.833	0.777
D	0.794	0.712	0.815
E	0.681	0.668	0.698
F	0.694	0.624	0.852
G	0.677	0.687	0.982
H	0.688	0.567	0.777
	7	8	9
A	0.459	0.456	0.478
B	0.724	0.655	0.726
C	0.848	0.791	0.888
D	0.823	0.984	0.982
E	0.858	0.795	0.751
F	0.754	0.686	0.637
G	0.739	0.663	0.619
H	0.644	0.688	0.566
	10	11	12
A	0.556	0.539	0.523
B	0.849	0.862	0.892
C	0.896	0.979	0.877
D	0.979	0.998	0.910
E	0.898	0.845	0.849
F	0.689	0.667	0.884
G	0.621	0.634	0.888
H	0.533	0.607	0.897



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN  
UNIVERSITAS NEGERI YOGYAKARTA  
**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT**

*Alamat: Karangmalang, Yogyakarta. 55281.*  
*Telp. (0274) 550839 Fax. (0274) 518617. e-mail: lppm.uny@gmail.com*

---

**SURAT PERJANJIAN INTERNAL**  
**PELAKSANAAN PENELITIAN HIBAH BERSAING**  
**NOMOR : 040/APHB-BOPTN/UN34.21/2013**

Pada hari ini selasa tanggal delapan belas bulan Juni tahun dua ribu tiga belas kami yang bertanda tangan di bawah ini :

1. Prof. Dr. Anik Ghufon. : Ketua Lembaga Penelitian Dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Negeri Yogyakarta yang berkedudukan di Yogyakarta dalam hal ini bertindak untuk dan atas nama perguruan tinggi tersebut; selanjutnya disebut PIHAK PERTAMA.
2. EVY YULIANTI, S.Si.,M.Sc. : Ketua Tim Peneliti dari Penelitian Hibah Bersaing, yang beralamat di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Yogyakarta, selanjutnya disebut PIHAK KEDUA.

Surat Perjanjian Internal ini berdasarkan :

1. Undang-undang Republik Indonesia No. 20 Tahun 2003, tentang Sistem Pendidikan Nasional;
2. Undang-undang Republik Indonesia No. 17 Tahun 2003, tentang Keuangan Negara;
3. Undang-undang Republik Indonesia No. 01 Tahun 2004, tentang Perbendaharaan Negara;
4. Undang-undang Republik Indonesia No. 15 Tahun 2004, tentang Pemeriksaan dan Tanggung Jawab Keuangan Negara;
5. Peraturan Presiden No. 47 Tahun 2009, tentang Pembentukan dan Organisasi Kementerian Negara;
6. Keputusan Menteri Pendidikan Nasional No. 975/A3/3/KU/2011, tentang Pengangkatan Pejabat Perbendaharaan/Pengelola Keuangan pada Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat;
7. Peraturan Menteri Pendidikan Nasional No. 31 Tahun 2010, tentang Organisasi dan Tata Keuangan Kementerian Pendidikan Nasional;
8. Peraturan Direktur Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan Nasional Republik Indonesia Nomor: 09/DIKTI/Kep/2011, tentang Petunjuk Teknis Kegiatan Penugasan di Lingkungan Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat;
9. Surat Perjanjian Penugasan dalam Rangka Pelaksanaan Program Penelitian Tahun Anggaran 2013. DIPA Universitas Negeri Yogyakarta No. : DIPA-023.04.2.189946/2013 tanggal 5 Desember 2012. Revisi ke-3 No.: DIPA-023.04.2.189946/2013 tanggal 6 Mei 2013.
10. Surat Keputusan Rektor UNY Nomor : 266a Tahun 2013, tanggal 1 Mei 2013 tentang penetapan pemenang dan judul penelitian desentralisasi Dana Bantuan Operasional Perguruan Tinggi.

PIHAK PERTAMA dan PIHAK KEDUA secara bersama-sama bersepakat mengikatkan diri dalam suatu Perjanjian Pelaksanaan Penelitian Hibah Bersaing dengan ketentuan dan syarat-syarat sebagai berikut:



## **Pasal 1**

PIHAK PERTAMA memberi tugas kepada PIHAK KEDUA, dan PIHAK KEDUA menerima tugas tersebut sebagai penanggung jawab dan mengkoordinasikan pelaksanaan Penelitian Hibah Bersaing dengan judul dan nama Ketua/Anggota Peneliti sebagai berikut :

Judul : Bioprospeksi Bakteri Termofilik Penghasil Cationic Antimicrobial Peptides (AMPs)  
Sebagai Agen Antikanker dan Antimikrobia  
Ketua Peneliti : EVY YULIANTI, S.Si.,M.Sc.  
Anggota : 1. ANNA RAKHMAWATI, M.Si  
2. dr. KARTIKA RATNA PERTIWI, M.Biomed.Sc  
3.

## **Pasal 2**

- (1) PIHAK PERTAMA memberikan dana Penelitian yang tersebut pada Pasal 1 sebesar Rp 40.000.000,00 (Empat puluh juta rupiah) yang dibebankan kepada Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran (DIPA) Universitas Negeri Yogyakarta No. : DIPA-023.04.2.189946/2013 tanggal 5 Desember 2012. Revisi ke-3 No.: DIPA-023.04.2.189946/2013 tanggal 6 Mei 2013.
- (2) PIHAK KEDUA berhak menerima dana tersebut pada ayat (1) dan berkewajiban menggunakan sepenuhnya untuk pelaksanaan penelitian sebagaimana pasal 1 sampai selesai sesuai ketentuan pembelanjaan keuangan negara.

## **Pasal 3**

Pembayaran dana Penelitian Hibah Bersaing ini akan dilaksanakan melalui Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat UNY dan dibayarkan secara bertahap dengan ketentuan sebagai berikut :

- (1) Tahap Pertama 70% sebesar Rp.28.000.000,00 (Dua puluh delapan juta rupiah) setelah Surat Perjanjian ini ditandatangani oleh kedua belah pihak.
- (2) Tahap Kedua 20% sebesar Rp. 8.000.000,00(Delapan juta rupiah) setelah PIHAK KEDUA menyerahkan Laporan Akhir Hasil Pelaksanaan Penelitian kepada PIHAK PERTAMA dalam bentuk hardcopy sebanyak 6 (enam) eksemplar disertai softcopy (CD dalam format "pdf") paling lambat tanggal 20 Nopember 2013.
- (3) Tahap Ketiga 10% sebesar Rp 4.000.000,00 (Empat juta rupiah) setelah PIHAK KEDUA menyerahkan Hasil Kinerja Penelitian kepada PIHAK PERTAMA dalam bentuk hard copy sebanyak 3 (tiga) disertai Sofcopy ( CD dalam bentuk format "PDF" )
- (4) PIHAK KEDUA wajib membuat Laporan Kemajuan Pelaksanaan Penelitian dan Laporan Penggunaan Keuangan sejumlah termin I sebesar 70%, dan diserahkan kepada PIHAK PERTAMA dalam bentuk hardcopy masing-masing 2 (dua) eksemplar paling lambat tanggal 13 September 2013.
- (5) PIHAK KEDUA berkewajiban mempertanggungjawabkan pembelanjaan dana yang telah diterima dari PIHAK PERTAMA dan menyimpan bukti-bukti pengeluaran yang telah disesuaikan dengan ketentuan pembelanjaan keuangan Negara.
- (6) PIHAK KEDUA berkewajiban mengembalikan sisa dana yang tidak dibelanjakan kepada PIHAK PERTAMA untuk selanjutnya disetorkan ke Kas Negara.

#### Pasal 4

PIHAK KEDUA berkewajiban untuk:

- (1) Mempresentasikan hasil penelitiannya pada seminar yang akan dilaksanakan oleh Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan, Jakarta;
- (2) Mendaftarkan hasil penelitiannya untuk memperoleh HKI;
- (3) Memanfaatkan hasil penelitian untuk proses bahan mengajar;
- (4) Mempublikasikan hasil penelitiannya pada jurnal yang terakreditasi.
- (5) Membayar PPh pasal 21, PPh pasal 22, PPh pasal 23 dan PPn sesuai ketentuan yang berlaku
- (6) Mengikuti Seminar dari Awal sampai dengan selesai

#### Pasal 5

- (1) Jangka waktu pelaksanaan penelitian yang dimaksud Pasal 1 ini selama 6 (enam) bulan terhitung mulai 27 Mei 2013 sampai dengan 27 Nopember 2013, dan PIHAK KEDUA harus menyelesaikan Penelitian yang dimaksud dalam Pasal 1 selambat-lambatnya **20 Nopember 2013**.
- (2) PIHAK KEDUA harus menyerahkan kepada PIHAK PERTAMA berupa :
  - a. Laporan Akhir Hasil Penelitian dalam bentuk hardcopy sebanyak 6 (enam) eksemplar, dan dalam bentuk soft copy (CD dalam format **\".pdf\"**) sebanyak 1 (satu) keping.
  - b. Artikel Ilmiah untuk dimasukkan ke Jurnal di melalui Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat UNY, yang terpisah dari laporan sebanyak 2 (dua) eksemplar
- (3) Laporan hasil penelitian dalam bentuk hard copy harus memenuhi ketentuan sebagai berikut :
  - a. Bentuk/ukuran kertas kuarto
  - b. Warna cover ORANGE
  - c. Di bagian bawah kulit ditulis :  
**Dibiayai oleh DIPA Universitas Negeri Yogyakarta dengan Surat Perjanjian Penugasan dalam rangka Pelaksanaan Program Penelitian Hibah Bersaing Tahun Anggaran 2013 Nomor: 532a/BOPTN/UN34.21/2013 Tanggal 27 Mei 2013**
- (4) Selanjutnya laporan tersebut akan disampaikan ke :
  - a. Perpustakaan Nasional Republik Indonesia, Jakarta sebanyak 1 (satu) eks.
  - b. PDII LIPI Jakarta sebanyak 1 (satu) eks.
  - c. BAPPENAS c.q. Biro APKO Jakarta sebanyak 1 (satu) eks.
  - d. Perpustakaan Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat UNY sebanyak 3 (tiga) eks.
- (5) Apabila batas waktu habisnya masa penelitian ini PIHAK KEDUA belum menyerahkan Laporan Akhir Hasil Penelitian kepada PIHAK PERTAMA, maka PIHAK KEDUA dikenakan denda sebesar 1% (satu persimil) setiap hari keterlambatan sampai dengan setinggi-tingginya 5% (lima persen) dari nilai surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Penelitian, terhitung dari tanggal jatuh tempo yang telah ditetapkan sampai dengan berakhirnya pembayaran dana Hibah Penelitian oleh Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan.

#### Pasal 6

- (1) Apabila ketua peneliti sebagaimana dimaksud pasal 1 tidak dapat menyelesaikan pelaksanaan penelitian ini, maka PIHAK KEDUA wajib menunjuk pengganti ketua pelaksana sesuai dengan bidang ilmu yang diteliti dan merupakan salah satu anggota tim;



- (2) Bagi Peneliti yang tidak dapat menyelesaikan kewajibannya dalam Tahun Anggaran yang sedang berjalan dan waktu proses pencairan biayanya telah berakhir, maka seluruh dana yang belum sempat dicairkan dinyatakan hangus dan kembali ke Kas Negara.
- (3) Apabila PIHAK KEDUA tidak dapat melaksanakan tugas sebagaimana dimaksud pada pasal 1 maka harus mengembalikan seluruh dana yang telah diterimanya kepada PIHAK PERTAMA, untuk selanjutnya disetor ke Kas Negara.
- (4) Apabila dikemudian hari terbukti bahwa judul-judul penelitian sebagaimana dimaksud pada Pasal 1 dijumpai adanya indikasi duplikasi dengan penelitian lain dan/atau diperoleh indikasi ketidakjujuran dan itikad kurang baik yang tidak sesuai dengan kaidah ilmiah, maka penelitian tersebut dinyatakan batal dan PIHAK KEDUA wajib mengembalikan seluruh dana penelitian yang telah diterimanya kepada PIHAK PERTAMA untuk selanjutnya disetor ke Kas Negara.

#### **Pasal 7**

Hak Kekayaan Intelektual yang dihasilkan dari pelaksanaan penelitian tersebut diatur dan dikelola sesuai dengan peraturan dan perundang-undangan yang berlaku.

#### **Pasal 8**

Hasil penelitian berupa peralatan dan / atau alat yang dibeli dari kegiatan penelitian ini adalah milik negara yang dapat dihibahkan kepada Universitas Negeri Yogyakarta atau Lembaga Pemerintah lain melalui Surat Keterangan Hibah.

#### **Pasal 9**

Surat Perjanjian Internal Pelaksanaan Penelitian ini dibuat rangkap 2 (dua), dan masing-masing dibubuhi meterai sesuai dengan ketentuan yang berlaku, dan biaya meterainya dibebankan kepada PIHAK KEDUA.

#### **Pasal 10**

Hal-hal yang belum diatur dalam perjanjian ini akan ditentukan kemudian oleh kedua belah pihak secara musyawarah.

PIHAK KEDUA  
Ketua Peneliti,



EVY YULIANTI, S.Si., M.Sc.  
NIP 198007262005012001

PIHAK PERTAMA  
Ketua LPPM  
Universitas Negeri Yogyakarta



Prof. Dr. Anik Ghufon  
NIP. 19621111 198803 1 001



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN  
UNIVERSITAS NEGERI YOGYAKARTA  
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT  
Alamat: Karangmalang, Yogyakarta. 55281.  
Telp. (0274) 550839 Fax (0274) 518617. e-mail: lppm.uny@gmail.com

### BERITA ACARA PELAKSANAAN SEMINAR PROPOSAL/INSTRUMEN PENELITIAN

1. Nama Peneliti : E.Vy. Yulianti - S.Si. M-Sc.
2. Jurusan/Prodi : Pendidikan Biologi
3. Fakultas : FMIPA
4. Skim Penelitian : Prospektif Bakteri / Biologi APHB
5. Judul Penelitian : Bio.pros.peksi bakteri keanekaragaman penghasil antibiotik dari mikroba peptidase (AMP-ase) seg. Anti kanker dan Anti mikroba
6. Pelaksanaan : Tanggal 4/7 Jam 8.30
7. Tempat : R. Sidang LPPM
8. Dipimpin oleh : Ketua Prof. Dr. Sri Atun  
Sekretaris Dr. Das. Salirawati, MSi
9. Peserta yang hadir :
 

a. Konsultan	..... orang
b. Nara sumber	..... orang
c. BPP	..... orang
d. Peserta lain	..... orang
Jumlah	..... orang

### SARAN-SARAN

Heru Kuswanto, Ph.D

- ~ Pemilihan suhu berdasarkan apa?
- ~ Apa ada optimasi lagi?

Prof. Dr. Sri Atun

- ~ Kalau sudah pernah penelitian perlu dituliskan dalam latar belakang
- ~ Proteinnya masih berupa apa? Ekstrak?
- ~ Peptidase-nya belum teridentifikasi spesifik?

10. Hasil Seminar;

Setelah mempertimbangkan penyajian, penjelasan, argumentasi serta sistematika dan tata tulis, seminar berkesimpulan bahwa proposal penelitian tersebut di atas:

- a. Diterima, tanpa revisi/pembenahan usulan/instrumen/hasil
- b. Diterima, dengan revisi/pembenahan
- c. Dibenahi untuk diseminarkan ulang

Ketua Sidang



Prof. Dr. Sri Atun

NIP: 19651012 199001 2001

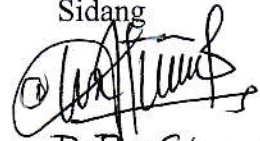
Mengetahui  
Badan Pertimbangan  
Penelitian



Prof. Dr. Sri Atun

NIP: 19651012 199001 2001

Sekretaris  
Sidang



Dr. Das Satirawati, MSI

NIP: 19651016 199203 2001



# DAFTAR HADIR SEMINAR PELITIAN

Jenis Seminar : Desain Proposal/Instrumen Penelitian  
 Hari, Tanggal : Kamis, 4 Juli 2013  
 Pukul : 07.30 - Selesai  
 Tempat : Ruang Sidang LPPM  
 Kelompok :

No.	N A M A	GELAR	TANDA TANGAN	
1	SAHID	M.Sc.	1. ....	1. ....
2	RR LIS PERMANA SARI	Dra. M.Si.	2. ....	2. ....
3	JASLIN IKHSAN	Ph.D.	3. ....	3. ....
4	EVY YULIANTI S.	S.Si., M.Sc.	4. ....	4. ....
5	ATMINI DHORURI		5. ....	5. ....
6	KUSWARI HERNAWATI S	S.Si, M.Kom	6. ....	6. ....
7	RAHAYU DWI S R	M.Pd.	7. ....	7. ....
8	ELLY ARLIANI	M.Si.	8. ....	8. ....
9	HARI SUTRISNO	Dr. M.Si.	9. ....	9. ....
10	NUR KADARISMAN	Drs. M.Si.	10. ....	10. ....
11	SABAR NUROHMAN	S.Pd.Si., M.Pd.	11. ....	11. ....
12	EDI ISTIYONO	Drs. M.si.	12. ....	12. ....
13	Antuni Wiyarsi	M.Si	13. ....	13. ....
14	MOHAMMAD ADAM JERUSALEM	MT.	14. ....	14. ....
15	MOHAMMAD ALI		15. ....	15. ....
16	NUCHRON	Dr. M.Pd	16. ....	16. ....
17	ICHDA CHAYATI	M.P.	17. ....	17. ....
18	YURIANI	M.Pd.	18. ....	18. ....
19	DJOKO LARAS BUDYO TARUNO	M.Pd.	19. ....	19. ....
20	WIDARTO	Dr. M.Pd.	20. ....	20. ....
21	GIRI WIYONO	MT	21. ....	21. ....
22	SAMSUL HADI		22. ....	22. ....
23	DWI RAHDIYANTA	Dr. M.Pd.	23. ....	23. ....
24	THOMAS SUKARDI		24. ....	24. ....
25	HARYANTO	Dr. M.Pd.	25. ....	25. ....
26	FITRI RAHMAWATI	M.P.	26. ....	26. ....
27	Heru Kuswanto	Dr	27. ....	27. ....
28	Sri Atun	Prof. Dr	28. ....	28. ....
29	Das Salirawati	Dr	29. ....	29. ....
30	Herminarto Sofyan	Prof. Dr	30. ....	30. ....
31	Siti Hamidah	Dr	31. ....	31. ....
32	Tien Aminatun	Dr	32. ....	32. ....
33	Suharjana	Prof. Dr	33. ....	33. ....
34	BM. Woro Kushartanti	Dr	34. ....	34. ....
35	Nur Rohmah Muktiani	M.Si	35. ....	35. ....

Yogyakarta, 4 Juli 2013  
 Ketua Sidang

.....





**BERITA ACARA  
PELAKSANAAN SEMINAR HASIL PENELITIAN DANA BOPTN**

1. Nama Peneliti : Evy Juliani, M.Sc.....
2. Jurusan/Prodi : Jurdik Biologi / Biologi.....
3. Fakultas : FMIPA.....
4. Skim Penelitian : Hibah Bersaing.....
5. Judul Penelitian : Biosprospeksi Bakteri Termofilik Penghasil Cationic Antimicrobial Peptide (AMP).....  
Sebagai Agen Antikanker dan Antamikroba.....
6. Pelaksanaan : Tanggal 14 Nopember 2012 J a m 07.30 - 14.00
7. Tempat : Ruang Sidang LPPM - UNY
8. Dipimpin oleh : Ketua ...Dr. Suyanta.....  
Sekretaris ...Evy Juliani, M.Sc.....
9. Peserta yang hadir : a. Konsultan :..... orang  
b. Nara sumber :..... orang  
c. BPP :.....1..... orang  
d. Peserta lain :.....1..... orang  
Jumlah :.....2..... orang

**SARAN -SARAN**

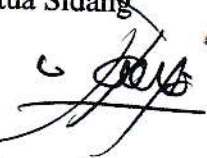
1. Isolatnya sejak kapan ?
2. Sel kankernya sel apa ?
3. Kriteria anti kanker.
4. Menggunakan kontrol positif Doxo.
5. Yang untuk tahun kedua pakai yang poten saja D153?

10. Hasil Seminar;

Setelah mempertimbangkan penyajian, penjelasan, argumentasi serta sistematika dan tata tulis, seminar berkesimpulan bahwa hasil penelitian tersebut di atas :

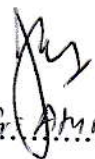
- a. Diterima, tanpa revisi/pembenahan hasil Penelitian
- b. Diterima, dengan revisi/pembenahan
- c. Dibenahi untuk diseminarkan ulang

Ketua Sidang

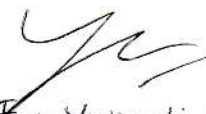
  
Dr. Suyanta...

NIP: .....

Mengetahui  
Badan Pertimbangan  
Penelitian




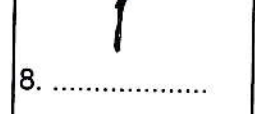

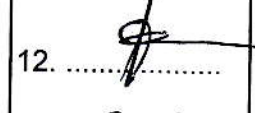

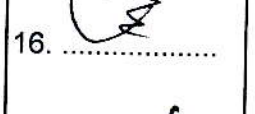

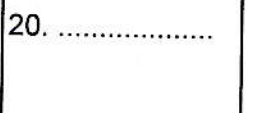
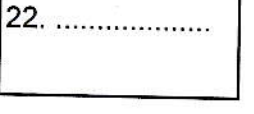





  
Prof. Sr. Alim  
NIP: .....

Sekretaris  
Sidang


  
Ruy. Yulianti, M.Sc.  
NIP: 19800726200501 2001

# DAFTAR HADIR SEMINAR HASIL PENELITIAN

Jenis Seminar :  
 Hari/tanggal :  
 Waktu :  
 Tempat :  
 Kelompok : 3 & 4

No.	N A M A	GELAR	TANDA TANGAN	
1	SAHID	M.Sc	1. ....	
2	RR LIS PERMANA SARI	M.Si	2. ....	
3	EVY YULIANTI	M.Sc	3. ....	
4	HARI SUTRISNO	Dr.	4. ....	
5	RADEN ROSNAWATI	M.Si	5. ....	
6	EDDY PURNOMO	M.Kes	6. ....	
7	Sudiyono AD	M.Sc	7. ....	
8	Pramudiyanto	M.Eng	8. ....	
9	Darmono	M.T.	9. ....	
10	Faqih Ma'arif	M.Eng	10. ....	
11	Moh. Khairudin	M.T.	11. ....	
12	Mashoedah	M.T.	12. ....	
13	SUTOPO	M.T.	13. ....	
14	Dr. Endang Mulyatiningsih	Dr.	14. ....	
15	DJOKO LARAS BUDYO TARUNO	M.Pd	15. ....	
16	Suyanta	Dr.	16. ....	
17	Sri Atun	Prof. Dr.	17. ....	
18	Mujiyono	Dr.	18. ....	
19	Siti Hamidah	Dr.	19. ....	
20			20. ....	
21			21. ....	
22			22. ....	
23			23. ....	

Yogyakarta,  
 Ketua Sidang

  
 Sri Atun.